LABORATORIUM VOOR PHYTOPATHOLOGIE
WAGENINGEN, NEDERLAND
DIRECTEUR Prof. Dr. A. J. P. OORT

MEDEDELING No. 170

INWENDIGE ONTSMETTING VAN DOOR *ASCOCHYTA PISI* AANGETASTE ERWTEZADEN MET DE ANTIBIOTICA RIMOCIDINE EN PIMARICINE, BENEVENS ENKELE ASPECTEN VAN HET PARASITISME VAN DEZE SCHIMMEL

WITH A SUMMARY

INTERNAL SEED DESINFECTION OF PEAS INFECTED BY *ASCOCHYTA PISI* BY MEANS OE THE ANTIBIOTICS RIMOCIDIN AND PIMARICIN, AND SOME ASPECTS OF THE PARASITISM OF THIS FUNGUS

DOOR
J. DEKKER

Werkgroep voor inwendige therapie bij planten

Overdruk uit: Tijdschrift over Plantenziekten 63 : 65-144, 1957
H. VEENMAN & ZONEN – WAGENINGEN

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
3 OCT 1957

MEDEDELINGEN VAN HET LABORATORIUM VOOR PHYTOPATHOLOGIE

Research papers of the Laboratorium voor Phytopathologie

124. OORT, A. J. P., Nederlandse namen voor aaltjes (Nematoden). (Dutch names for eelworms (Nematodes). T.Pl.-ziekten **56**: 169–171, 1950.
125. SEINHORST, J. W., Stengelaaltjes en knollenaaltjes bij aardappelen. Landbouwk. Tijdschr. **61** (9), 1949.
126. OORT, A. J. P., De vatbaarheid van zomergerst voor stuifbrand. 14e Nacobrouw Jaarb. 1950.
127. BRUYN, H. L. G. DE, Het kweken van Phytophthora-resistente aardappelrassen.
128. ROZENDAAL, A., Vertegenwoordigen bepaalde aardappelpootmachines een gevaar? Meded. N.A.K. **6**: 104, 1950.
129. GIRGINKOÇ, H. R., Untersuchungen über die „Zwarte houtvatenziekte" der Futter- und Zuckerrübe, verursacht durch Phythium irregulaire Buisman. With a summary. Meded. Landbouwhogeschool **51**: 1–61, 1951.
130. HENKENS, CH. H., Een bacterie-ziekte in stoppelknollen. (A bacterial disease of turnips.) T.Pl.-ziekten **57**: 124, 126, 1951.
131. BRUYN, H. L. G. DE, Pathogenic differentiation in Phytophthora infestans (Mont.) De Bary Phytopathol. Zeitschr. **18** (3), 1951.
132. ROZENDAAL, A., Nieuwe virusproblemen bij de aardappel. Meded. N.A.K. **8**: 94–98, 1952.
133. KERLING, L. C. P., Beschadiging en schimmelaantasting bij erwten als gevolgen van nachtvorst. (Damage and attack by fungi as consequences of late frost on peas.) T.Pl.-ziekten **58**: 29–54, 1952.
134. RAALTE, H. M. VAN, Het effect van metaal-ionen op de fungistatistische werking van natrium dimethyl dithiocarbamaat.
135. WEBER, A. PH. e.a., A predacious amoeboid organism destroying larvae of the potato root eelworm and other nematodes. Nature **169**: 834, 1952.
136. OORT, A. J. P., Van moederkorenvergiftiging tot moederkorencultuur. (From ergotism to ergot cultivation.) Meded. Dir. van de Tuinb. **15**: 743–757, 1952.
137. OORT, A. J. P., Taksterfte bij bramen veroorzaakt door Septocyta ramealis (Rob.) Pet. (Die-back of blackberry caused by Septocyta ramealis (Rob.) Pet. T.Pl.-ziekten **58**: 247–550, 1952.
138. RAALTE, M. H. VAN, Inwendige therapie van infectieziekten bij planten. Vakbl. voor Biologen **32** (11), 1952.
139. KERLING, L. C. P., Het overgaan met zaad van de Amerikaanse vaatziekte van erwten. (Seed transmission of Fusarium wilt of peas.) T.Pl.-ziekten **58**: 236–239, 1952.
140. LAAN, P. A. VAN DER, Een schimmel als parasiet van de cyste-inhoud van het aardappelcystenaaltje (Heterodera rostochiensis Wollenw.). (A fungal parasite of the cyst contents of the potato root eelworm. T.Pl.-ziekten **59**: 101–103, 1953.
141. LAAN, P. A. VAN DER, Aaltjes als parasieten van planten. Vakbl. voor Biologen **33** (10), 1953.
142. OORT, A. J. P., Het eerste optreden van Phytophthora in het voorjaar. Landb.voorlichting **11**: 116–120, 1954.
143. ROZENDAAL, A., De betekenis van verschillende virusgroepen voor de teelt van pootgoed. Landb. voorlichting **11**: 299–308, 1954.
144. LAAN, P. A. VAN DER, Nader onderzoek over het aaltjes vangende amoeboide organisme theratromyxa Weberi Zwillenburg. T.Pl.-ziekten **60**: 139–145, 1954.
145. KOLE, A. P., Waarnemingen over het gedrag van zoösporangia van Olpidium brassicae (Wor.) Dang. T.Pl.-ziekten **60**: 135–137, 1954.
146. HIDDEMA, J. en KOLE, A. P., Enkele waarnemingen over versmelten van zoösporen bij Phytophthora infestans (Mont.) de Bary. T.Pl.-ziekten **60**: 138–139, 1954.
147. ZAAG, D. E. VAN DER, Looftrekken of doodspuiten? T.o.Pl.-ziekten **60**: 256–258, 1954.
148. RAGETLI, J. en WANT, J. P. H. VAN DER. Paper chromatography of plant viruses. Proc. K.N.A.W. Amsterdam C **57**: 621–627, 1954.
149. RAALTE, M. H. VAN, A test for translocation of fungicides through plant tissues. C. R. du IIIe Congrès Int. de Phytopharmacie, Paris **2**, 1952.
150. DEKKER, J., Internal Seed Disinfection by an Antibiotic from Streptomyces rimosus. Nature **175**: 689, 1955.
151. LAAN, P. A. VAN DER en BIJLOO, J. D., Bepaling van de cyste-inhoud van het aardappel-cystenaaltje (Heterodera rostochiensis Woll.) door fluorchromeren met acridine orange. (Viability Test of the Cyst Contents of the Potato Root Eelworm by Fluorescent Staining with Acridin Orange). T.Pl.-ziekten **61**: 69–75, 1955.

T.Pl.ziekten 63 (1957): 65–144

INWENDIGE ONTSMETTING VAN DOOR ASCOCHYTA PISI AANGETASTE ERWTEZADEN MET DE ANTIBIOTICA RIMOCIDINE EN PIMARICINE, BENEVENS ENKELE ASPECTEN VAN HET PARASITISME VAN DEZE SCHIMMEL[1])

With a summary:

Internal seed desinfection of peas infected by Ascochyta pisi by means of the antibiotics rimocidin and pimaricin, and some aspects of the parasitism of this fungus

DOOR

J. DEKKER

Laboratorium voor Phytopathologie, Landbouwhogeschool, Wageningen
(Mededeling 170)

INHOUD

Algemene inleiding 67

I. Enkele aspecten van het parasitisme van Ascochyta pisi 69
1. Inleiding 69
2. Materiaal en methodiek 70
3. Plaats van de schimmel in het zaad 71
4. Aantasting van de plant vanuit het zaad 72
A. Wijze waarop het jonge kiempje aangetast wordt 72
B. Invloed van bodemtemperatuur, aard en vochtgehalte van de grond, en lichtintensiteit op het aantal zieke planten 75
C. Aanwezigheid van de schimmel in plantedelen en planten waarop geen symptomen te zien zijn 79
D. Anatomisch onderzoek 82
5. Verspreiding van Ascochyta pisi in het veld 82
6. Aantasting der peulen en zaden 87
7. Aantasting der zaden door mycelium uit planten zonder symptomen 89
8. Bespreking 90

II. Enkele eigenschappen van rimocidine en pimaricine 93
1. Inleiding 93
2. Materiaal en methodiek 96
3. Fungicide werking 97
4. Structuur en stabiliteit 99
5. Bespreking 101

[1]) Dit onderzoek is uitgevoerd in het kader van de Werkgroep voor Inwendige Therapie bij Planten T.N.O. en mede mogelijk gemaakt door financiële steun van de Organisatie Z.W.O.

III. Interne ontsmetting van door Ascochyta pisi aangetaste zaden met rimocidine en pimaricine 103
1. Inleiding 103
2. Materiaal en methodiek 106
3. Filtreerpapier-toets en kasproeven 107
A. Weken der zaden in een oplossing van rimocidine 107
B. Weken der zaden in een oplossing van pimaricine 112
C. Toediening der antibiotica op andere wijze 113
Pap-behandeling (slurry) 113
Poeder-behandeling 114
Behandeling met een suspensie in methanol 115
4. Veldproeven 116
A. 1955 116
B. 1956 117
5. Effect van de antibiotica op kieming van het zaad, ontwikkeling van de plant en opbrengst 119
6. Inwendige zaadontsmetting met antibiotica in vergelijking met middelen op basis van tetramethylthiuramdisulfide en organische kwikverbindingen 123
7. Bespreking 124

IV. Nader onderzoek betreffende de inwendige werking van rimocidine en pimaricine 125
1. Inleiding 125
2. Materiaal en methodiek 125
3. Binding aan het weefsel van het zaad 126
4. Binnendringen in het zaad 127
5. Onderdrukking van Ascochyta pisi in het zaad 130
6. Bespreking 133

Samenvatting 134

Summary 136

Literatuur 143

ALGEMENE INLEIDING

Door ontsmetting van zaaizaad kunnen vele planteziekten op een doeltreffende wijze bestreden worden. Het zaad wordt hiertoe met chemische middelen behandeld, waardoor ziektekiemen, die zich op of oppervlakkig in het zaad bevinden, onschadelijk gemaakt worden. Vooral organische kwikverbindingen en tetramethylthiuramdisulfide (TMTD) worden algemeen en met succes voor dit doel gebruikt. Niet afdoende echter zijn deze middelen tegen die parasieten, die dieper in het zaad doordringen. Ter bestrijding van deze laatsten dienen middelen aangewend te worden, die aan de drie volgende eisen voldoen. Ze moeten het zaad kunnen binnendringen, de parasiet doden, en onschadelijk voor het zaad zijn. De werking moet dus selectief zijn. Van de gastheer en parasiet, die immers beide tot het plantenrijk behoren, mag de eerste niet beschadigd en moet de laatste gedood worden. Tot nu toe zijn nog geen middelen in de handel, die aan de bovengenoemde eisen voldoen. Wel kunnen sommige inwendig in het zaad aanwezige pathogenen door een warmwaterbehandeling gedood worden, zoals stuifbrand bij granen (JENSEN, 1888), doch deze methodiek heeft ook bezwaren, terwijl hij bij andere zaden niet goed mogelijk is, of teleurstellende resultaten geeft.

In het kader van de werkzaamheden van de Werkgroep voor Inwendige Therapie bij Planten, T.N.O., is onderzoek verricht betreffende de vraag in hoeverre antibiotica een oplossing kunnen bieden voor dit probleem. Als proefobject werd door *Ascochyta pisi* LIB. aangetast erwtezaad gebruikt. Deze schimmel dringt de zaadhuid binnen en infecteert in vele gevallen ook het kiempje en de cotylen. Ontsmetting met oppervlakkig werkende middelen heeft dan ook weinig of geen resultaat.

Van enige bekende antibiotica en van een aantal cultuurvloeistoffen van schimmels en bacteriën (waaronder actinomyceten) werd onderzocht of zij effect hadden tegen de genoemde schimmel in het zaad. Hierbij werd een zeer sterk ontsmettende werking waargenomen van de voedingsbodem waarop *Streptomyces rimosus* SOBIN, FINLAY & KANE was gekweekt, terwijl een nadelige invloed op de zaden niet te constateren viel. Het tegen *Ascochyta pisi* werkzame antibioticum in deze voedingsbodem kon geïdentificeerd worden met het kort te voren in Amerika ontdekte rimocidine, waarmee enige proeven verricht waren tegen huidschimmels, doch waarmee nog weinig geëxperimenteerd was op phytopathologisch gebied, voor zover de schaarse literatuur over dit antibioticum hierover uitsluitsel geeft. Daar de firma Pfizer uit New York, waar het antibioticum ontdekt was, bereid was enige rimocidine af te staan, kon het onderzoek hiermee voortgezet worden, in plaats van met de onzuivere voedingsbodem. Later werd nog een nieuw antibioticum bij het onderzoek betrokken, nl. het door de Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N.V. ontdekte pimaricine, een product van *Streptomyces natalensis*.[1])

Tijdens dit onderzoek kwamen enkele punten betreffende de levenscyclus van *Ascochyta pisi* naar voren, die in de literatuur niet, onvolledig of onjuist be-

[1]) Ned. Octrooiaanvrage 205.345.

schreven waren, en waarvan een nader onderzoek gewenst was voor een goed begrip van het effect, dat zaadbehandeling met antibiotica kan opleveren. Deze worden in hoofdstuk I behandeld. In hoofdstuk II wordt de werking van de antibiotica in vitro besproken, en het verband tussen stereo-isomere configuratie en fungicide werking. Het derde hoofdstuk handelt over de aspecten van zaaizaadontsmetting met intern werkende antibiotica. De resultaten, hiermee verkregen, worden vergeleken met enkele in de practijk gebruikte middelen op basis van TMTD en organisch kwik. Tenslotte wordt in hoofdstuk IV nader ingegaan op de inwendige werking.

De firma Chas. Pfizer & Co., Inc. te New York en de Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N.V. te Delft ben ik veel dank verschuldigd voor de royale wijze, waarop zij rimocidine respectievelijk pimaricine ter beschikking stelden.

HOOFDSTUK I

ENKELE ASPECTEN VAN HET PARASITISME VAN ASCOCHYTA PISI

1. INLEIDING

De vlekkenziektes op de erwt worden onderscheiden in de lichte vlekkenziekte, veroorzaakt door *Ascochyta pisi* LIB., en de donkere vlekkenziekte, veroorzaakt door *Mycosphaerella pinodes* (BERK. & BLOX) VESTERGR. en *Ascochyta pinodella* JONES. Alle drie parasieten vormen vlekken op de bovengrondse delen van de plant, doch de beide laatstgenoemde tasten ook de stengelvoet en de schors van het wortelstelsel aan, en staan dan ook bekend als veroorzakers van voetziekte.

Dit onderzoek heeft in de eerste plaats betrekking op *Ascochyta pisi*, die uitsluitend de bovengrondse delen van de plant aantast. Op de bladeren en peulen van geïnfecteerde planten verschijnen min of meer ronde, op de stengel meer langwerpige lichtbruine vlekken met donkere rand, in het centrum waarvan pycniden gevormd worden. Op de peul dringt de schimmel door de vruchtwand heen en bereikt de zaden, waarin hij tenminste 6 jaar zijn vitaliteit kan behouden (BONDARTZEVA-MOTEVERDE e.a., 1937). Hoewel infectie van de kiemplant ook kan plaats hebben vanuit vlak voor het zaaien in de grond aangebrachte plantendelen zoals sterk aangetaste peulen (OGILVIE & MULLIGAN, 1932), en *Ascochyta pisi* ook diverse *Lathyrus*- en *Vicia*-species (SPRAGUE, 1929) en zelfs de vruchten van appels en tomaten kan aantasten (WOLLENWEBER & HOCHAPFEL, 1936), nemen BUTLER & JONES (1949) toch aan, dat onder natuurlijke omstandigheden de ziekte uitsluitend met het zaaizaad overgaat. Men neemt verder aan dat verspreiding in het veld voornamelijk plaats heeft met spattende en door de wind meegevoerde regendruppels (JONES, 1927). Hiermee is te verklaren dat de ziekte het sterkst optreedt in een nat seizoen, en dat in droge zomers de schade zeer gering is. Verder volgt hieruit dat we de schimmel meer zullen aantreffen in vochtige gebieden dan in streken met een uitgesproken droog seizoen.

Behalve in Nederland komt *Ascochyta pisi* voor in nagenoeg alle Europese landen, in Palestina, Rusland, India, China, Japan, Malakka, Ceylon, Midden- en Zuid-Afrika, Marokko, Noord- en Zuid-Amerika, Australië en Nieuw-Zeeland. (Commonwealth Mycological Institute, Distribution Maps of Plant Diseases, no. 272, 1953).

De schade bestaat in het niet opkomen van zwaar aangetaste zaden (RATHSCHLAG, 1930), minder goede ontwikkeling van aangetaste planten (BUTLER & JONES, 1949) en vooral minder goede kwaliteit van het geoogste product door het voorkomen van vlekken op de zaden. Door *Ascochyta pisi* aangetaste planten gaan meestal niet dood. Hoewel in de literatuur verscheidene gevallen genoemd worden van een gedeeltelijke of zelfs totale mislukking van het gewas te velde (KRÜGER, 1895, VAN HOOK, 1906, JONES, 1911), moet de oorzaak hiervan toch vermoedelijk gezocht worden in een aantasting door *Mycosphaerella*

pinodes en *Ascochyta pinodella*. De drie schimmels werden nl. vóór 1927 nog niet goed onderscheiden. Hoewel ook na dit jaar nog een geval gemeld wordt van oogstmislukking door *Ascochyta pisi* (OGILVIE & MULLIGAN, 1932), mag toch wel aangenomen worden dat de beide eerste hierboven genoemde factoren, nl. verminderde opkomst en slechte ontwikkeling der planten, doorgaans niet de voornaamste schade veroorzaken. Slechts onder extreme omstandigheden, wanneer gewerkt wordt met sterk aangetast zaad in een zeer nat seizoen, kan zware veldschade verwacht worden. HICKMAN (1941) meent dan ook dat, wanneer niet meer dan 20% van het zaad aangetast is, dit slechts weinig invloed op de stand van het gewas heeft. Veel ernstiger is echter het verlies aan kwaliteit van het zaad. Zwaar aangetaste zaden zijn okerachtig verkleurd en minder mooi van vorm, terwijl ook de smaak slecht is. Dit laatste bleek uit een proef met een monster zwaar aangetast Eminent zaad (80% *Ascochyta pisi*) uit 1954, waarvan de smaak door mej. A. VEENBAAS[1]) als zeer slecht (cijfer 2) beoordeeld werd. Met ultraviolet licht uit hetzelfde monster uitgezochte, zoveel mogelijk gezonde zaden werden beoordeeld met het cijfer 6 van een 10-delige schaal. Hierbij moet in aanmerking genomen worden dat het ras Eminent niet als rijpe erwt geconsumeerd wordt.

Volgens LAMMERS (mond. med.) mag het percentage zaden, dat vanwege inferieure kwaliteit gemiddeld jaarlijks uitgelezen moet worden, op 15% gesteld worden. Wanneer volgens een ruwe schatting de helft hiervan op rekening van *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes* en *Ascochyta pinodella* zou komen, en we de waarde van de inferieure zaden, het zg. piksel, op één derde stellen van dat van gezonde zaden, dan zou dat een jaarlijkse opbrengstderving van 5% betekenen. Op een oogst van 100.000 ton erwten in Nederland is dit een aanmerkelijke schade. In de uitermate vochtige jaren 1954 en 1956 was de schade zeker nog veel groter. Een pikselpercentage van 40% was geen uitzondering. Volgens DE TEMPE (mond. med.) was ruim een vierde deel van alle landbouwerwten voor meer dan 15% door *Ascochyta pisi* aangetast. Voor sommige tuinbouwrassen was dit percentage nog veel hoger. Zelfs kwamen partijen voor met 80% *Ascochyta pisi*.

Bij de proeven betreffende interne ontsmetting van erwtezaden met antibiotica, welke in hoofdstuk III en IV besproken zullen worden, bleek dat sommige antibiotica het zaad kunnen binnendringen en de schimmel doden, doch dat de schimmel in een gering percentage der zieke zaden niet gedood wordt. In verband hiermee was het van belang te onderzoeken hoe de schimmel in het zaad gelocaliseerd is en op welke wijze zieke planten ontstaan uit aangetast zaad (hoofdstuk I, 3 en 4). Verder was het van belang te weten in welke mate de enkele zieke plantjes uit zaden, die onvoldoende door het antibioticum ontsmet zijn, de omringende gezonde planten kunnen infecteren. Hiertoe is de verspreiding van de ziekte in het veld onderzocht, (hoofdstuk I, 5) en de wijze waarop de peulen en het zaad aangetast worden (hoofdstuk I, 6 en 7).

2. MATERIAAL EN METHODIEK

Op het eind van het zeer vochtige seizoen 1954 stond een partij zaad van het ras Eminent ter beschikking, die – bepaald volgens de hieronder te bespreken filtreerpapier-toets – voor ruim 80% aangetast was door de schimmel *Ascochyta*

[1]) Instituut voor Biologisch en Scheikundig Onderzoek van Landbouwgewassen.

pisi. Deze partij, die weinig *Mycosphaerella pinodes* en *Ascochyta pinodella* bevatte, leende zich uitstekend voor het onderzoek en hiermee zijn dan ook het merendeel der proeven genomen. Wanneer gesproken wordt over zwaar aangetast Eminent zaad, dan wordt daarmee steeds deze partij bedoeld.

De mate van aantasting van het zaad werd op 3 manieren onderzocht.

1. Met behulp van ultraviolet licht. Door *Ascochyta pisi* aangetaste zaden lichten hierin geel op. Evenwel is dit niet bij alle aangetaste zaden het geval. Anderzijds wijst een geel oplichten niet altijd op *Ascochyta pisi*. Deze methode moet dus met de nodige voorzichtigheid gehanteerd worden, en kan in feite alleen maar gebruikt worden voor een oriëntering.

2. In de filtreerpapier-toets. De zaden werden uitgelegd op vochtig filtreerpapier in geperforeerde zinken bakjes, die geplaatst werden in een grote platte zinken bak, welke met een glasplaat afgedekt werd. De zaden werden vooraf behandeld met sublimaat 0,2% om de ontwikkeling van uitwendig op het zaad voorkomende schimmels en bacteriën te verhinderen. Een dun laagje watten werd onder het filtreerpapier gelegd, waardoor dit minder snel uitdroogde. De zaden, waarop zich mycelium van *Ascochyta pisi* ontwikkeld had, werden na 5 dagen geteld.

3. Door uitzaaien van het zaad in grond. Dit geschiedde meestal in houten bakjes, 25 bij 25 cm, en 12 cm hoog. De zieke planten, die uit aangetast zaad opgroeiden, werden geteld en daarna verwijderd om verdere besmetting tegen te gaan. De laatste beoordeling had na 3 à 4 weken plaats. Wanneer de planten gedurende langere tijd opgekweekt moesten worden, bv. voor zaadwinning, werd gebruik gemaakt van Mitscherlichpotten, die 22 cm hoog waren, en waarvan de diameter 20 cm bedroeg. Hierin bevond zich een dubbele geperforeerde bodem en een uitlaat voor het overtollige water. Gietwater werd toegediend in een trechter, waardoor dichtslaan van de grond voorkomen werd. Voor bepaalde proeven had dit bovendien het voordeel, dat verspreiding van *Ascochyta pisi* met sproeiwater voorkomen werd. Meestal werd gebruik gemaakt van gestoomde grond, die samengesteld was uit humusrijke zandgrond, vermengd met verteerd beukenblad, compost en stalmest.

Bij onderzoek op aanwezigheid van schimmelmycelium in planten, werden deze vooraf gedurende 20 seconden tot 1 minuut met 0,1–0,2% sublimaat ontsmet.

3. PLAATS VAN DE SCHIMMEL IN HET ZAAD

Reeds JONES (1927) vermeldt dat *Ascochyta pisi* tot in het zaad doordringt, en dat zaadbehandeling met organische kwikmiddelen het ontstaan van zieke plantjes uit dit zaad niet verhindert. Dat de schimmel zich onder de zaadhuid kan bevinden blijkt uit de mededeling van RATHSCHLAG (1930), dat het kiempje aangetast kan zijn. OGILVIE & MULLIGAN (1932) vonden, dat de schimmel door ontsmetting met ceresan bij 1/3 deel der aangetaste zaden gedood werd, waaruit zij meenden te kunnen concluderen, dat 2/3 deel der zaden inwendig aangetast was. Deze onderzoekers maakten slechts onderscheid tussen oppervlakkige en niet oppervlakkige aantasting zonder dit te preciseren.

Teneinde nader te onderzoeken in hoeverre de schimmel behalve in de zaadhuid ook tot in de cotylen en het kiempje doordringt, werden van 100 zaden uit

een sterk aangetaste partij Eminent, de zaadhuid, de cotylen en het kiempje apart uitgelegd; de beide eerste onderdelen op vochtig filtreerpapier en het kiempje in een petrischaal op agar. Na 8 dagen werd het aantal zaadhuiden, cotylen en kiempjes geteld, waarop mycelium gegroeid was. Voor elke erwt werd nu nagegaan, in welke delen van het zaad de schimmel zich bevond (tabel 1).

TABEL 1. Verdeling van Ascochyta pisi in het erwtezaad. 100 zaden, ras Eminent, zwaar aangetast.
Table 1. Distribution of Ascochyta pisi in pea seeds. 100 seeds, variety Eminent, heavily infected.

mycelium op:	*mycelium on:*	aantal/*number*	
alléén zaadhuid	*seed coat alone*		17
zaadhuid + 1 cotyl	*seed coat + 1 cotyledon*	24	33
zaadhuid + 2 cotylen	*seed coat + 2 cotyledons*	9	
zaadhuid + kiempje alleen	*seed coat + embryo alone*	2	42
zaadhuid + kiempje + 1 cotyl	*seed coat + embryo + 1 cotyledon*	4	
zaadhuid + kiempje + 2 cotylen	*seed coat + embryo + 2 cotyledons*	36	
geen der zaaddelen	*no part of the seed*		8

Bij 75% der zaden blijkt de schimmel dieper dan de zaadhuid, en bij 42% zelfs tot in het kiempje te zijn doorgedrongen. Verder blijkt dat, wanneer behalve de zaadhuid, slechts 1 cotyl aangetast is, het kiempje meestal geen mycelium bevat, doch dat, wanneer beide cotylen aangetast zijn, het kiempje meestal ook geïnfecteerd is.

In een op dezelfde wijze opgezette tweede proef werden de bovengenoemde resultaten geheel bevestigd. In deze laatste proef was bovendien uit elk cotyl een centrumstukje geponst, waarvan de diameter bijna de helft was van die van het opgezwollen cotyl. Nadat de buitenhelft van deze uitgeponste cylindertjes verwijderd was, werden ze uitgelegd op havermoutagar. Bij 10% der zaden bleek op deze, uit het centrum geponste stukjes mycelium te groeien, waaruit dus duidelijk blijkt, dat de schimmel zich tot diep in het zaad kan bevinden.

4. AANTASTING VAN DE PLANT VANUIT HET ZAAD

A. Wijze waarop het jonge kiempje aangetast wordt

Door JONES (1927) werden op de eerste blaadjes van jonge plantjes reeds *Ascochyta*-vlekken waargenomen. Hij veronderstelde, dat infectie tijdens het kiemen had plaats gehad. Verder nam hij waar dat aangetaste plantjes na opkomst zelden sterven. OGILVIE & MULLIGAN (1932) vonden vlekken op de stengels, voornamelijk ter hoogte van het grondoppervlak, doch nooit beneden de cotylen. Zij veronderstelden dat delen van de stengel tijdens de kieming in contact komen met de cotylen, waardoor infectie zou plaats hebben. Deze vlekken zouden tot diep in de stengel kunnen doordringen en afsterving veroorzaken.

In het onderstaande is de wijze, waarop uit aangetaste zaden zieke planten groeien, nader onderzocht. Daarbij is aandacht geschonken aan de betekenis van

het mycelium, dat zich respectievelijk in het kiempje, de zaadhuid en de cotylen bevindt.

Wanneer zaad, dat op natuurlijke wijze door *Ascochyta pisi* aangetast is, uitgezaaid wordt in de kas bij een temperatuur van ongeveer 15°C, dan zijn aan de uit deze zieke zaden groeiende kiemplanten geen symptomen waar te nemen gedurende de eerste anderhalve week na uitzaaien. Daarna verschijnt op de stengel, meestal op de plaats waar deze van lichtgekleurd in groen overgaat, een grijs, enigszins ingezonken vlekje, dat zich ontwikkelt tot een sterker ingezonken vlek met een donkerbruine rand en een lichter centrum, waarin vaak binnen 24 uur pycniden ontstaan (fig. 17). Vaak verschijnen alleen vlekken op de blaadjes, of op stengel en bladeren beide. In het laatste geval hebben we dikwijls met in ontwikkeling achterblijvende plantjes te doen, die in vochtig milieu te gronde gaan. Het merendeel der planten met symptomen blijft echter in leven en vormt op deze wijze een besmettingsbron voor de omringende gezonde planten. Fig. 1 geeft een indruk van het tijdstip waarop de symptomen zichtbaar worden bij zieke planten uit aangetaste zaden

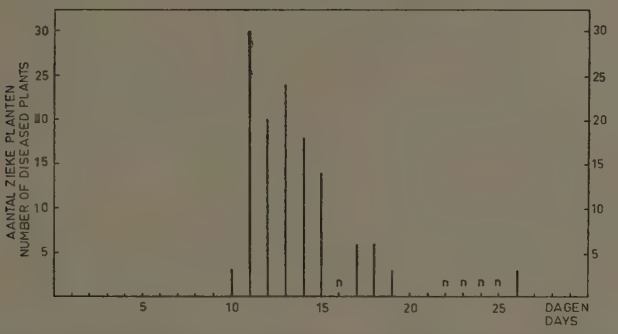


FIG. 1. Verschijnen van ziektesymptomen in dagen na het uitzaaien. 504 zaden, ras Eminent, zwaar aangetast, vooraf geweekt. Opkomst (totaal 319 planten) van de 4e tot de 6e dag. n = geen waarneming.

Appearance of symptoms on seedlings in days after sowing. 504 pre-soaked seeds, variety Eminent, heavily infected. Emergence (total 319 plants) between the 4th and 6th day after sowing. n = no observation.

Uit de bovenstaande figuur blijkt, dat onder de gegeven omstandigheden de eerste symptomen 10 dagen na uitzaaien en ± 5 dagen na opkomst der planten verschijnen, en dat bij de meeste zieke planten de symptomen op de 11e tot en met de 15e dag na het uitzaaien zichtbaar worden.

Theoretisch zijn er 4 mogelijkheden, waarop uit aangetast zaad een ziek plantje kan ontstaan.

1. Het kiempje is al aangetast vóór het uitzaaien.
2. Tijdens de kieming groeit de schimmel vanuit de cotylen of de zaadhuid in het tot dusver nog niet aangetaste kiempje. Hierbij is de kieming gerekend te duren tot het tijdstip waarop het pluimpje door de zaadhuid heengebroken is.
3. De schimmel groeit nà de kieming vanuit zaadhuid of cotylen in het stengeltje.

4. De schimmel wordt op andere wijze van het zaad op het jonge plantje overgebracht, b.v. door bodemorganismen of met spattende regendruppels.

In kasproeven met steriele grond in Mitscherlichpotten, waarin de planten niet besproeid worden, doch het water in een trechter toegediend wordt, en waarin geen bodemorganismen aanwezig zijn, ontstaan uit aangetast zaad echter niet minder zieke planten dan in veldproeven. Hieruit volgt dat de vierde mogelijkheid, zo die in het veld al eens mocht voorkomen, in ieder geval niet van betekenis is.

De drie eerstgenoemde mogelijkheden zijn in de volgende proeven onderzocht.

Zwaar aangetast Eminent zaad werd, na 24 uur weken in water, uitgezaaid in gestoomde grond. De helft werd, vóór het uitzaaien, van de zaadhuid ontdaan, de andere helft niet. Uit 200 ongepelde zaden ontstonden 35 zieke planten, doch uit 200 gepelde zaden slechts 10. Hieruit volgt dat 25, ofwel 71 %, van de zieke planten aangetast is door uit de zaadhuid afkomstig mycelium, terwijl slechts 10, ofwel 29 %, der zieke planten ziek zijn door infectie vanuit de cotylen, of doordat het kiempje reeds voor de kieming aangetast was. Kiemaantasting vanuit de zaadhuid overweegt dus sterk ten opzichte van het reeds aangetast zijn van het kiempje vóór de kieming.

Om na te gaan wanneer binnendringen van mycelium vanuit de zaadhuid in het kiempje plaats heeft, werd een proef ingezet, waarbij een aantal zaden op diverse tijdstippen na het zaaien opgegraven, gepeld en daarna weer uitgezaaid werd. Er werden 150 zaden per object gebruikt uit een zwaar aangetaste partij Eminent; de zaden waren voor het uitzaaien geweekt in water. De opkomst en het aantal zieke planten is weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Invloed van het tijdstip waarop de zaadhuid verwijderd wordt op het aantal zieke planten. Ras Eminent, zwaar aangetast. 150 zaden per object.

Table 2. Influence of time of peeling the seeds on the number of diseased plants. Variety Eminent, heavily infected. 150 seeds per treatment.

gepeld: *peeled:*	opkomst *emergence*	ziek *diseased*
vóór uitzaaien *prior to sowing*	112	9
1 dag na uitzaaien *1 day after sowing*	100	3
3 dagen na uitzaaien *3 days after sowing*	101	28
niet gepeld *not peeled*	108	28

Wegnemen van de zaadhuid vlak voor het uitzaaien of 1 dag erna vermindert in sterke mate het aantal zieke planten, doch pellen na 3 dagen heeft geen effect op het aantal zieke planten. Klaarblijkelijk heeft aantasting van gezonde kiempjes plaats vanuit de zaadhuid op de tweede en de derde dag na het uitzaaien van gezwollen zaden. Op de derde dag was de kieming nog niet afgelopen. De aantasting van de kiempjes vanuit de zaadhuid heeft dus tijdens de kieming plaats, en het is niet waarschijnlijk dat na de kieming nog in belangrijke mate kiemaantasting plaats heeft. Hiermede is aannemelijk gemaakt dat ook de derde hierboven genoemde mogelijkheid van ontstaan van zieke planten uit aangetast zaad geen, of in ieder geval slechts een geringe rol speelt, zodat alleen de beide eerste mogelijkheden overblijven, die in het voorgaande reeds besproken zijn.

Samenvattend kan dus opgemerkt worden dat het merendeel der zieke planten ontstaat doordat kieminfectie door mycelium vanuit de zaadhuid plaats heeft tijdens de kieming, en een kleiner gedeelte, doordat het kiempje reeds voor de kieming aangetast is of door kieminfectie vanuit de cotylen.

Verder komt een gedeelte der zaden niet op doordat het kiempje te sterk door de schimmel aangetast is, en geeft een ander deel der zieke zaden planten zonder symptomen. Het laatste zou o.a. veroorzaakt kunnen worden doordat de aantasting te ver van het kiempje verwijderd zit, zodat het mycelium dit tijdens de kieming niet tijdig kan bereiken. Dit laatste is onderzocht in een proef, waarbij uitgegaan werd van zaden, die in verschillende mate door *Ascochyta pisi* waren aangetast. Met behulp van ultraviolet licht, zoals beschreven in hoofdstuk I, 2, werden zaden uitgezocht met de volgende graden van aantasting, uitgedrukt in percentage van het zaadoppervlak, dat geel oplicht:

1. uiterlijk gezond: geen geel oplichten.
2. licht: hoogstens 10% van het oppervlak.
3. zwaar: ongeveer 50% van het oppervlak.
4. zeer zwaar: meer dan 70% van het oppervlak.

Van elke categorie werden 100 zaden uitgezaaid in twee kistjes met gestoomde grond. Het aantal opgekomen en het aantal zieke planten is vermeld in tabel 3.

TABEL 3. Invloed van de graad van aantasting op de opkomst en het aantal zieke planten. 100 zaden, ras Eminent.

Table 3. Influence of the rate of infection on the emergence and the number of diseased plants. 100 seeds, variety Eminent.

		opkomst *emergence*	aantal zieke planten *number of diseased plants*
uiterlijk gezond	*appearance healthy*	95	4
licht aangetast	*slightly infected*	91	6
zwaar aangetast	*heavily infected*	78	25
zeer zwaar aangetast	*very heavily infected*	61	35

Naarmate de graad van aantasting zwaarder is, is de opkomst geringer, en het aantal zieke planten groter. Opvallend is dat ook uit de uiterlijk gezonde zaden nog zieke planten groeien. Dit houdt dus in dat een zo geringe aantasting van het zaad mogelijk is, dat onder ultraviolet licht geen oplichting is waar te nemen. Van de zaden uit het licht aangetaste object geeft, hoewel ze alle een *Ascochyta*-vlekje bezitten, slechts 6% zieke planten. Hier zal dus vermoedelijk de afstand van het mycelium tot het kiempje gemiddeld te groot geweest zijn, zodat in vele gevallen de schimmel het kiempje niet tijdig kon bereiken. Ook uit de zwaar en zeer zwaar aangetaste zaden blijkt nog een vrij groot aantal planten zonder symptomen te groeien. Dat de schimmel desondanks in vele gevallen toch in de stengel aanwezig kan zijn, zal in hoofdstuk I, 4C besproken worden.

B. Invloed van bodemtemperatuur, aard en vochtigheid van de grond, en lichtintensiteit op het aantal zieke planten

Gedurende de twee jaar, dat gewerkt werd met dezelfde partij door *Ascochyta pisi* aangetast Eminent zaad, werd waargenomen dat de aantallen zieke planten,

die hieruit ontstonden, vaak sterk schommelden. Aangezien de graad van aantasting van zaad tot zaad sterk varieert, zal bij proeven met relatief weinig zaden het toeval een belangrijke rol spelen. Doch ook, wanneer men met grote aantallen zaden werkt, kan het percentage zieke planten in verschillende proeven nog uiteenlopen van 15 tot 40%. In het volgende wordt nader onderzocht, welke uitwendige omstandigheden invloed hebben op het percentage zieke planten. In tabel 4 is het aantal zieke planten uit 500 Eminent zaden, gezaaid op 7 juli 1955, vergeleken met het aantal in een even grote proef, gezaaid op 5 augustus 1955. De zaden waren uitgezaaid in bakjes, elk met 50 zaden, na 24 uur geweekt te zijn in water.

TABEL 4. Invloed kastemperatuur op 2e en 3e dag na uitzaaien op het aantal zieke planten. Ras Eminent, zwaar aangetast, zaden vooraf geweekt.

Table 4. Influence of the temperature in the glasshouse on the 2nd and 3rd day after sowing on the number of diseased plants. Variety Eminent, heavily infected, seeds pre-soaked.

zaaidatum	*time of sowing*	7 juli 1955	5 aug. 1955
aantal zaden	*number of seeds*	500	500
aantal zieke planten	*number of diseased plants* .	99	198
max. temp. op 2e en 3e dag na uitzaaien	*max. temp. on 2nd and 3rd day after sowing*	±28°C	±21°C

Bij de proef van 5 aug. blijkt het aantal zieke planten twee maal zo hoog te zijn als bij de proef van 7 juli, terwijl toch in beide gevallen zaad uit één partij gebruikt werd. In een vorige proef (tabel 2) was gevonden, dat op de 2e en 3e dag na uitzaaien van voorgeweekt zaad kieminfectie plaats had door mycelium vanuit de zaadhuid. Daar het waarschijnlijk leek, dat juist in deze periode de bodemtemperatuur invloed zou hebben, zijn de kastemperaturen op de genoemde dagen met elkaar vergeleken. Deze bleken in de juli-proef veel hoger te liggen dan in de augustus-proef, terwijl de temperaturen op de andere dagen in beide proeven weinig verschilden.

Deze gegevens wezen dus sterk in de richting van een temperatuursinvloed. Naar aanleiding van deze toevallige waarneming is een proef ingezet in Wisconsin-tanks, waarin de bodemtemperatuur kunstmatig op een bepaald niveau gehouden kan worden. Een bak met 100 Eminent zaden werd in een tank bij 14°C geplaatst, en een andere bak in een tank bij 25°C. Op de vochtigheid van de grond werd gelet teneinde te voorkomen dat de bak bij de hogere temperatuur meer zou uitdrogen. In tabel 5 is het aantal opgekomen en zieke planten weergegeven.

TABEL 5. Invloed van de bodemtemperatuur op het aantal zieke planten. 100 zaden uit een zwaar aangetaste partij zaad (ras Eminent) uitgezaaid in Wisconsin-tanks bij 25°C en 14°C.

Table 5. Influence of the soil temperature on the number of diseased plants. 100 seeds from a heavily infected seed sample (variety Eminent) sown at 25° C or 14° C in Wisconsin tanks.

grondtemperatuur *temperature of soil*	opkomst *emergence*	aantal zieke planten *number of diseased plants*
25°C	59	9
14°C	64	32

Hiermede wordt dus bevestigd dat bij een hoge grondtemperatuur minder zieke planten verschijnen dan bij een lage. Dit wordt begrijpelijk wanneer men hetgeen in hoofdstuk I, 4A is meegedeeld over het ontstaan van zieke planten in aanmerking neemt. Het merendeel hiervan bleek nl. te ontstaan doordat tijdens de kieming mycelium vanuit de zaadhuid het kiempje binnendringt. Nu heeft bij de hogere temperatuur een snellere kieming plaats. Het lijkt waarschijnlijk dat in dat geval bij een aantal zaden het mycelium niet tijdig het kiempje kan bereiken, waarmee het geringer aantal zieke planten bij hogere temperatuur verklaard zou zijn.

Ook de aard van de grond kan grote invloed uitoefenen op de opkomst en het aantal zieke planten uit aangetast zaad. Dit bleek uit een proef, waarin 200 zaden uitgezaaid werden in gestoomde grond (zie I, 2) en in niet gestoomde zware rivierklei (tabel 6).

TABEL 6. Aantal opgekomen en zieke planten uit zwaar aangetast zaad, uitgezaaid in gestoomde grond en in niet gestoomde zware klei. Ras Eminent, 200 zaden.

Table 6. Number of emerged and diseased plants developed from heavily infected seed, sown in steamed soil or in non-steamed heavy clay. Variety Eminent, 200 seeds.

	opkomst *emergence*	zieke planten *diseased plants*	
		aantal *number*	in % van opkomst *in % of emergence*
gestoomde grond *steamed soil*	149	62	42
niet gestoomde zware klei *non-steamed heavy clay*	58	12	21

Klaarblijkelijk is in de niet steriele klei een groter aantal van de door *Ascochyta pisi* aangetaste zaden niet opgekomen tengevolge van de veel ongunstiger kiemingsomstandigheden, waardoor ook het percentage zieke planten ten opzichte van het totaal aantal opgekomen planten geringer is.

De invloed van het vochtgehalte van de grond op het aantal zieke planten werd onderzocht, door geweekte zaden uit te zaaien in Mitscherlichpotten met gestoomde grond, waarvan het vochtgehalte varieerde van zeer droog tot breiachtig nat. De vochtgehaltes, berekend op het totale gewicht van de gebruikte grond, bedroegen respectievelijk 41, 33, 25, 21, 15 en 10%. Per object werden steeds 3 potten, elk met 30 zaden, gebruikt. Het vochtgehalte van de grond werd op een bepaald niveau gehandhaafd door de potten geregeld te wegen en het tekort bij te vullen met water. Het totale aantal zieke planten, dat na 4 weken verschenen was, bleek niet te variëren tengevolge van het vochtgehalte van de grond. Bij de extreme waarden echter was de opkomst, en dientengevolge ook het aantal zieke planten, aanzienlijk minder.

Verder was reeds vroeger opgemerkt, dat in dat deel van de kas, dat aan de noordzijde gelegen was, het aantal zieke planten doorgaans geringer was, dan in de afdeling, die op het zuiden uitzag. Bovendien was waargenomen dat de voor *Ascochyta pisi* karakteristieke vlekken in het donker in het geheel niet verschenen; in plaats daarvan waren donkere strepen en vlekken te zien. Teneinde nu na te gaan of de intensiteit van het licht invloed heeft op het aantal zieke planten, is een proef uitgevoerd, waarin zwaar aangetast Eminent zaad uitgezaaid werd in bakjes, die tweemaal zo diep waren als de normaal gebruikte

bakjes. Deze werden slechts tot halverwege met grond gevuld. Bovendien werden ze overdekt met een kartonnen plaat, die aan 2 zijden een spleet van 2 cm openliet, waardoor licht kon binnentreden. Als controles werden normale niet afgedekte bakjes gebruikt. Deze proef en een tweetal herhalingen werden uitgevoerd in de maanden mei en juni, waarin de kastemperaturen schommelden tussen 18 en 23 °C (tabel 7).

TABEL 7. Aantal zieke planten, opgegroeid uit zwaar aangetast zaad (ras Eminent) onder normaal daglicht, en onder verminderd licht door gedeeltelijk afdekken der bakjes.

Table 7. Number of diseased plants, developed from heavily infected seed (variety Eminent), in daylight and reduced daylight, obtained by covering the flats partly.

proef no: *test no:*	belichting *light conditions*	aantal zaden *number of seeds*	aantal planten *number of plants*	aantal zieke planten *number of diseased plants*
1	daglicht[1])	150	96	31
	verminderd daglicht[1])	150	96	18
2	daglicht	150	90	53
	verminderd daglicht	150	87	31
3	daglicht	200	143	55
	verminderd daglicht	200	133	32

[1]) *daylight, reduced daylight*

Het is niet aan te nemen, dat het licht invloed uitoefent op de verhouding schimmel-zaad tijdens de kieming, die immers onder de grond plaats heeft. In een aantal gevallen heeft dus wel kieminfectie plaats, maar wordt het uitgroeien van de schimmel om de een of andere reden belemmerd, als gevolg waarvan geen karakteristieke vlekken ontstaan. In deze richting wijst ook de volgende proef, waarin de stengels van de planten uit proef no. 2, tabel 7, die geen symptomen vertoonden, in stukjes verdeeld en op agar uitgelegd werden. Onderzocht is uit hoeveel van deze planten mycelium van *Ascochyta pisi* groeide.

TABEL 8. Aanwezigheid van Ascochyta pisi in planten zonder symptomen. Planten uit proef no 2 (tabel 7) uitgelegd op agar.

Table 8. Presence of Ascochyta pisi in plants without symptoms. Plants of test no 2 (table 7) laid out on agar.

	planten zonder symptomen *plants without symptoms*	hiervan: *from these:*		ziek (tab. 7) *diseased (tab. 7)*	totaal aantal geïnfecteerd *total number of infected plants*
		zonder myc. *without myc.*	met myc. *with myc.*		
daglicht *daylight*	37	17	20	53	73
vermind. daglicht *reduced daylight*	56	20	36	31	67

Wanneer we dus planten uit ziek zaad opkweken in gedempt licht, dan ontstaan er minder planten met symptomen en blijven meer planten symptoomloos. Uit de bovenstaande tabel volgt, dat een groot aantal van deze laatste toch mycelium bevat, nl. 36 van de 56 bij gedempt licht en 20 van de 37 bij normaal licht. Tellen we bij het aantal symptoomloze planten, dat toch mycelium blijkt te herbergen, het aantal zieke planten op, dan blijkt dit voor beide objecten ongeveer gelijk te zijn nl. 73 resp. 67. Dit houdt dus in dat in beide

gevallen evenveel kiempjes aangetast worden, doch dat bij gedempt licht de schimmel zich minder gemakkelijk manifesteert. Het verschijnsel dat mycelium in planten zonder symptomen aanwezig kan zijn was aanleiding tot een nader onderzoek.

Hieronder zullen eerst de waarnemingen besproken worden betreffende de localisatie van de schimmel in planten met symptomen en vervolgens in planten, waarop geen symptomen te zien waren.

C. Aanwezigheid van de schimmel in plantendelen en planten waarop geen symptomen te zien zijn

Localisatie in planten met symptomen. Uit een aantal ruim één maand oude, vanuit-het-zaad zieke planten van het ras Eminent, werden er 4 uitgezocht, welke een uitgesproken vlek van *Ascochyta pisi* op de stengel vertoonden, en waarbij de afstand tussen cotylen en vlek 2 à 3 cm bedroeg. De planten werden goed afgespoeld met water, ontsmet met sublimaat 0,1 % en daarna afgespoeld met steriel water. Vervolgens werden ze in schijfjes van plm. 4 mm verdeeld en uitgelegd in petrischalen op kersagar. Na enkele dagen bleek bij drie planten op alle stukjes tussen het cotyl en de vlek mycelium gegroeid te zijn (fig. 19). Bij het vierde plantje bleek alleen op het zesde stukje vanaf de cotylen geen mycelium gegroeid te zijn. Ter controle werd van alle stukjes van één der plantjes mycelium geïsoleerd en geïdentificeerd. Dit bleek in alle gevallen van *Ascochyta pisi* te zijn. Hieruit volgt dus, dat *Ascochyta pisi*, waarvan men tot nu toe steeds aannam, dat deze op de plant slechts in de vlekken voorkwam, ook buiten deze vlekken aanwezig kan zijn zonder daar uitwendig waarneembaar te zijn.

Teneinde na te gaan of het bovengenoemde verschijnsel altijd optreedt, ook wanneer de vlekken op de bladeren zitten, en of de schimmel ook boven de vlek en mogelijk zelfs in planten zonder symptomen gevonden zou kunnen worden, zijn een groot aantal proeven genomen met planten van verschillende ouderdom. Deze zullen hieronder besproken worden. De stengels van deze planten werden, na verwijdering der bladen op de zo juist beschreven wijze behandeld en uitgelegd op kersagar. Na een week werd nagegaan op welke stukjes mycelium van *Ascochyta pisi* gegroeid was. De beoordeling of het mycelium inderdaad van deze schimmel was, geschiedde op het oog. Dit werd verschillende malen bij wijze van steekproef gecontroleerd door de schimmel van de stukjes te isoleren en te identificeren.

De resultaten uit een aantal proeven, waarin bij in totaal 72 vanuit-het-zaad zieke planten gelet werd op aanwezigheid van schimmelweefsel tussen cotylen en bladvlek, tussen cotylen en stengelvlek, en tussen stengelvlek en bladvlek, zijn weergegeven in tabel 9. Onder onderbroken wordt verstaan, dat de schimmel in het betreffende stengeldeel wel aangetroffen werd, doch niet in alle schijfjes ervan.

Uit deze tabel blijkt, dat bij het merendeel der planten mycelium gevonden wordt tussen cotylen en vlekken. Indien deze laatste op de stengel voorkomen, dan wordt meestal in alle stukjes tussen cotylen en vlek mycelium aangetroffen, doch indien ze op het blad voorkomen, doorgaans niet in alle stengelstukjes. In het laatste geval is de afstand tussen de cotylen en de vlek ook groter, en loopt de „myceliumketting", wanneer die aanwezig is, vermoedelijk meer kans

TABEL 9. Voorkomen van Ascochyta pisi in symptoomloze delen van 72 vanuit-het-zaad zieke planten (ras Eminent).

Table 9. Occurrence of mycelium of Ascochyta pisi in symptomless parts of 72 diseased plants, developed from infected seeds, variety Eminent.

planten met mycelium: *plants with mycelium:*	ononderbroken *non-interrupted*	onderbroken *interrupted*	geen mycelium *no mycelium*
tussen cotylen en stengelvlek . . . . . *between cotyledons and lesion on the stem*	30	12	6
tussen cotylen en bladvlek . . . . . *between cotyledons and lesion on a leaf*	1	16	7
tussen stengel- en bladvlek . . . . . *between stem lesion and leaf lesion*	2	6	4

in het snel groeiende en zich strekkende plantje verbroken te worden. Echter kan de afstand waarover de keten intact blijft, vrij groot zijn. Zo werd hierboven reeds beschreven, dat bij een aantal plantjes over een afstand van 2 tot 3 cm tussen cotylen en vlek ononderbroken mycelium aangetroffen werd; bij één ziek plantje met bladvlekken was zelfs over een afstand van ruim 3 cm mycelium in de stengel aanwezig.

Ook tussen stengel- en bladvlek wordt vaak mycelium aangetroffen, meestal echter niet zonder onderbrekingen.

Bij 48 zieke plantjes met uitsluitend een vlek op de stengel is erop gelet, of mycelium ook boven deze vlek aanwezig kan zijn. Dit bleek bij 34 planten het geval te zijn. In de meeste dier gevallen zat de schimmel slechts weinig hoger dan de vlek, doch in sommige gevallen wel 2 à 3 cm ononderbroken, en mét onderbrekingen over een nog veel grotere afstand.

Localisatie in planten zonder symptomen. Ook planten zonder symptomen, opgegroeid uit zwaar aangetast zaad van het ras Eminent, zijn onderzocht op aanwezigheid van *Ascochyta pisi*. Bij 50 van 128 onderzochte planten werd mycelium aangetroffen; bij 15 hiervan slechts in het eerste stengelstukje, doch bij 5 zelfs ononderbroken tot in de top van de stengel. Dit waren twee tot drie weken oude planten met een lengte van twee tot vier cm. Eén van de proeven met symptoomloze planten zal hieronder besproken worden.

In gestoomde grond werden 100 zaden uitgezaaid uit een sterk door *Ascochyta pisi* aangetaste partij Eminent zaad. Hiervan kwamen 42 zaden niet op, gaven 35 een zieke plant, en waren 23 planten zonder symptomen. Deze laatste planten werden met sublimaat ontsmet, en stengelschijfjes van deze met een lengte van 4 mm werden op kersagar uitgelegd. Op de stukjes van 15 planten groeide geen, op die van de overige 8 planten wel mycelium uit (fig. 2).

In verscheidene van deze planten bevindt het mycelium zich dus bijna ononderbroken door de gehele stengel, zonder zich uitwendig te manifesteren.

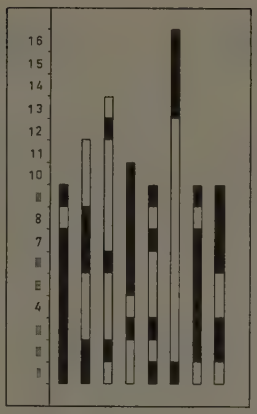
In hoofstuk I, 4A is beschreven, dat uit een aangetast zaad een ziek plantje kan ontstaan doordat het kiempje reeds voor de zwelling van het zaad aangetast was, of doordat mycelium uit de zaadlobben of de zaadhuid het kiempje bereikt vlak voor of tijdens het doorbreken van de zaadhuid. Het is nu denkbaar dat dit mycelium op één of meer plaatsen het kiempje binnendringt, daar blijft zitten tijdens de ontwikkeling van het plantje, en zich na enige tijd op de plaatsen

FIG. 2.

Voorkomen van mycelium in planten zonder symptomen, gegroeid uit aangetaste zaden. Stengels in stukjes van ± 4 mm uitgelegd op agar; de nummering der stukjes begint bij de cotylen.

Occurrence of mycelium in plants without symptoms, developed from infected seeds. The stems are cut in sections of ± 4 mm and plated out on agar; numbering is started at the cotyledons.

▬ stukje met mycelium / *section with mycelium*
▭ stukje zonder mycelium / *section without mycelium*



waar het binnengedrongen is, hetzij op de stengel, hetzij op de bladeren, al dan niet manifesteert. Het feit echter, dat soms ononderbroken door de hele stengel mycelium aangetroffen wordt, deed vermoeden, dat de schimmel ook aanwezig kan zijn in het topmeristeem en daarmee omhoog groeit, een myceliumketen in de stengel achterlatend, die al dan niet onderbroken kan zijn. Een steun voor deze laatste zienswijze geven proeven met sterk geëtioleerde plantjes, die hieronder besproken zullen worden.

Wanneer aangetast Eminent zaad na uitzaaien in het donker geplaatst wordt, groeien hieruit plantjes met uitermate langgerekte blanke stengels en bladeren zonder bladgroen. Op geen van deze planten ontwikkelen zich echter karakteristieke vlekken van *Ascochyta pisi*; wel verschijnen na ruim een week één of meer korte tot zeer lange bruine strepen, soms min of meer vlekachtig verbreed (fig. 18). In verscheidene gevallen liepen deze strepen van de cotylen tot aan de bladeren. Uit deze bruine over grote afstand doorlopende strepen kon steeds *Ascochyta pisi* geïsoleerd worden. Het over zulk een grote afstand aanwezig zijn van mycelium in een vaak continu bruine streep kan moeilijk anders verklaard worden, dan door een meegroeien van de schimmel met het topmeristeem. Zoals in hoofdstuk I, 4 D aangetoond zal worden, bevindt het mycelium zich in de epidermis en het buitenste schorsparenchym; wanneer nu de schimmel niet in het topmeristeem aanwezig zou zijn, zou deze zich vanuit de plaats, waar hij de kiem binnengedrongen is, over grote afstand actief in epidermis en buitenste schorslagen moeten verplaatsen, hetgeen moeilijk aan te nemen is. Ook voor deze geëtioleerde planten geldt, dat uiterlijk geheel gave planten over de gehele lengte van de stengel mycelium kunnen bevatten. Mogelijk is bij deze gezond uitziende planten te weinig mycelium aanwezig, om een met het blote oog waarneembare invloed op epidermis en buitenste schorslagen uit te oefenen.

Tenslotte dient nog vermeld te worden, dat in het zaad ook het worteltje sterk door *Ascochyta* aangetast kan zijn. In een enkel geval kon een paar dagen na de kieming nog mycelium uit het worteltopje geïsoleerd worden, doch bij oudere plantjes was dit nooit mogelijk; hoogstens kan daar mycelium geïsoleerd worden uit het direct tegen de cotylen gelegen hypocotyl.

D. Anatomisch onderzoek

De waarneming, dat *Ascochyta pisi* aanwezig kan zijn op plaatsen, waar geen symptomen optreden, was aanleiding tot een anatomisch onderzoek. Betreffende de localisatie van de schimmel in zieke planten, welke uit aangetaste zaden gegroeid zijn, waren in de literatuur geen gegevens te vinden.

Hiertoe werden een groot aantal dwars en lengtecoupes gemaakt door stengels van planten met en zonder symptomen. Deze werden met katoenblauw gekleurd. Op deze wijze werd een blauwkleuring van het mycelium verkregen die duidelijk afstak ten opzichte van het erwteweefsel.

Bij dit onderzoek bleek, dat het mycelium in stengelvlekken zich steeds bevond in de epidermis en de vlak daaronder liggende lagen van het schorsparenchym, meestal niet meer dan 4 cellagen diep. Nooit werd waargenomen, dat mycelium tot aan de endodermis reikte. In coupes door een vlek is het aangetaste weefsel ter dikte van 1 tot 3 à 4 cellagen in elkaar gezakt, hetgeen microscopisch als een indeuking van de stengelomtrek te zien is (fig. 3, 4, 5 en 6).

Myceliumdraden zijn het mooist waar te nemen, wanneer de vlek nog zeer jong is (fig. 8). Op plaatsen waar veel mycelium aanwezig is, begint direct onder de epidermis de aanleg van pycniden. Rijpe pycniden zijn waar te nemen in fig. 7.

In het algemeen was het moeilijk mycelium te vinden in coupes van het stengeldeel, gelegen tussen de cotylen en de vlek. Slechts zeven maal is het gelukt in dwarscoupes mycelium te vinden, en dan nog zeer weinig (fig. 9). Iets gemakkelijker was het mycelium op te sporen in tangentiale coupes. Ook boven de vlek kon mycelium anatomisch aangetoond worden. Verder werden een aantal coupes uit stengels van symptoomloze planten bekeken. Hierin werd geen mycelium aangetroffen. Dit is niet verwonderlijk wanneer we bedenken dat van 128 planten zonder symptomen slechts 5 planten mycelium in de gehele stengel bevatten (hoofdstuk I, 4C). Klaarblijkelijk is de hoeveelheid mycelium op die plaatsen in de plant, waar geen symptomen ontstaan, in het algemeen zeer gering.

5. VERSPREIDING VAN ASCOCHYTA PISI IN HET VELD

Wanneer rijpe pycniden van *Ascochyta pisi* met water in aanraking komen, beginnen ze lange slierten conidiën uit te stoten, die gehuld zijn in een slijmachtige massa. Door Jones (1927) wordt aangenomen, dat de verspreiding voornamelijk plaats heeft met spattende regendruppels over betrekkelijk korte afstand, doch onderzoek hieromtrent was nog niet verricht.

Om deze verspreiding te bestuderen werd in 1955 een veldproefje opgezet. Op een vierkant veldje van 15 bij 15 meter werd zo gezond mogelijk zaad van het ras Eminent uitgezaaid, met uitzondering van 1 m^2, waarop zwaar aangetast zaad van hetzelfde ras uitgezaaid werd. Dit ras is zeer geschikt om de verspreiding van plant tot plant na te gaan vanwege zijn grote vatbaarheid voor *Ascochyta pisi*. Het gezonde zaad werd verkregen uit een partij, die voor 40% aangetast was, door verwijdering van de in ultraviolet licht geel oplichtende zaden en behandeling van de rest van het zaad met rimocidine (weken in een oplossing van 100 p.p.m. in water gedurende 24 uur). De besmettingsbron werd een weinig ten zuid-westen van het centrum geplaatst.

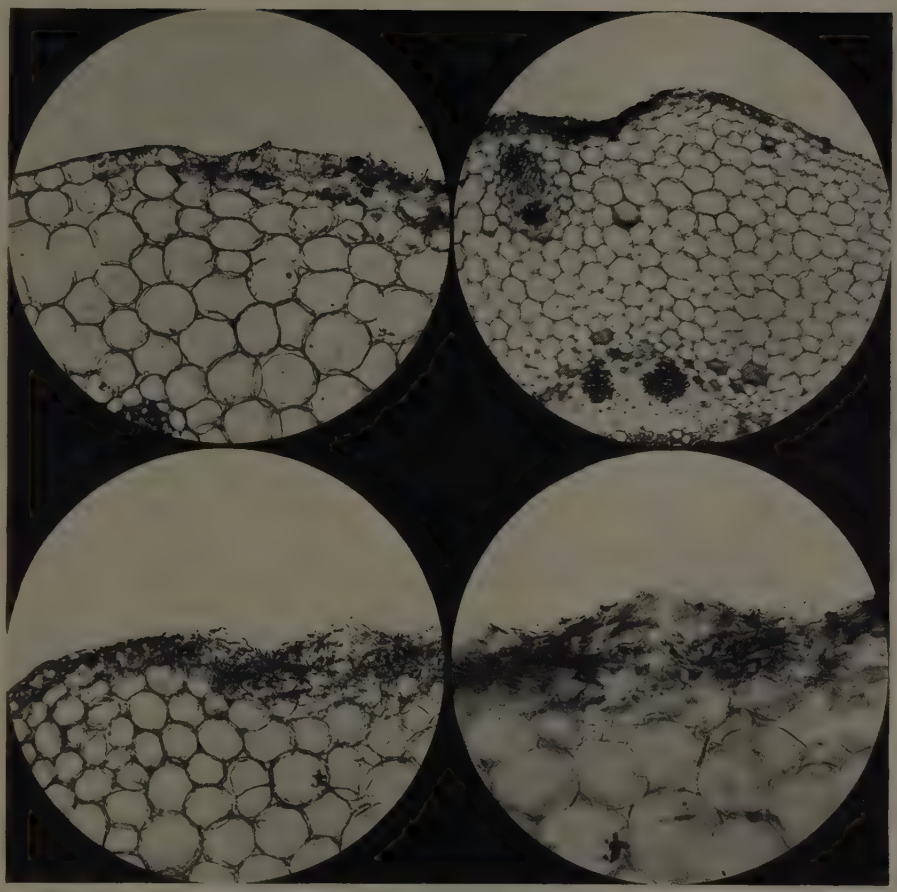


FIG. 3 T M 6. Vlekken op stengels van zieke planten, opgegroeid uit aangetaste zaden.
Lesions on stems of diseased plants, developed from infected seeds.

FIG. 3. Nog nauwelijks zichtbare vlek; dwarsdoorsnede, 90 ×.
Hardly visible lesion; cross section, 90 ×.

FIG. 4. Reeds duidelijk ingevallen vlek; dwarsdoorsnede, 60 ×.
Collapsed tissue of stem lesion; cross section, 60 ×.

FIG. 5. Destructie van epidermis en buitenste schorslagen; dwarsdoorsnede, 90 ×.
Destruction of epidermis and outer cortex layers; cross section, 90 ×.

FIG. 6. Vergroting van gedeelte van fig. 5, 120 ×.
Enlargement of part of fig. 5, 120 ×.

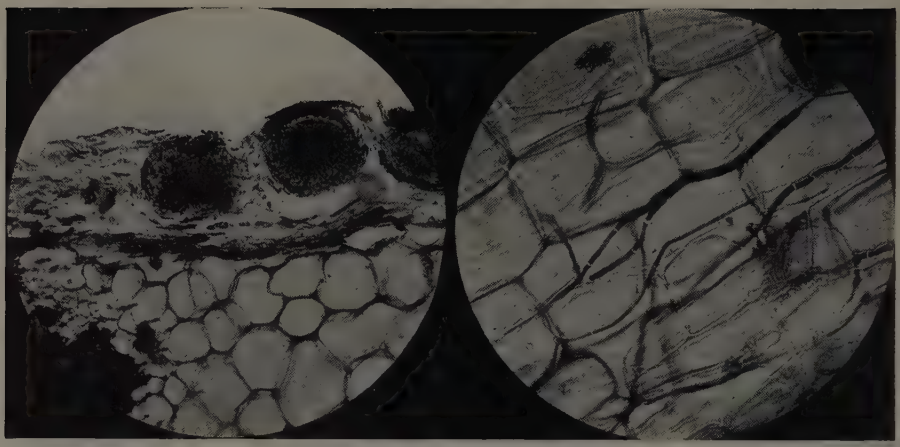


FIG. 7 FIG. 8

FIG. 7. Rijpe pycniden in stengelvlek; dwarsdoorsnede, 120 ×.
Mature pycnidia in stem lesion; cross section, 120 ×.

FIG. 8. Myceliumdraden in schorsparenchym; tangentiale doorsnede, 240 ×.
Hyphae in cortex parenchyma; tangential section, 240 ×.

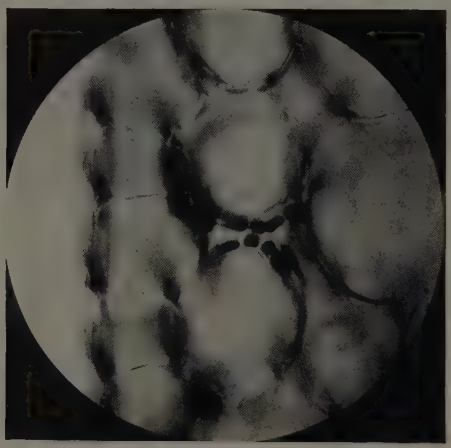


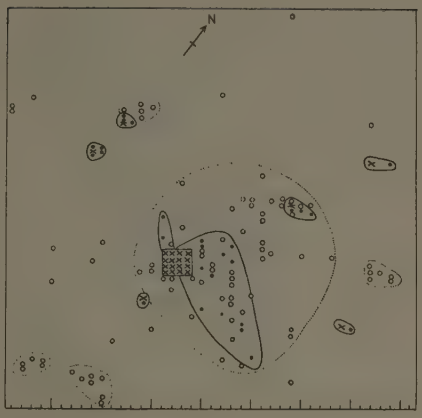
FIG. 9. Symptoomloos stengeldeel van zieke plant, gelegen tussen cotylen en vlek op de stengel; mycelium onder de intacte epidermis; dwarsdoorsnede, 600 ×.
Symptomless part of the stem of a diseased plant, situated between cotyledons and lesion on the stem; mycelium under the intact epidermis; cross section, 600 ×.

FIG. 10.

Verspreiding van Ascochyta pisi vanuit een haard (1 m² met zieke planten, gegroeid uit aangetast zaad) over een veld met gezonde planten, 15 bij 15 m. Ras Eminent, gezaaid 7 april. Beoordeling 28 mei–3 juni (●●), en 24–27 juni (oo). × = zieke plant uit een aangetaste erwt.

Distribution of Ascochyta pisi from a focus (1 m², containing diseased plants developed from infected seeds) over a plot with healthy plants, 15 by 15 m. Variety Eminent, sown 7th April. Assessment 28th May–3rd June (●●), and 24th–27th June (oo).

× = diseased plant developed from an infected seed.



In de 6e week na uitzaaien, omstreeks half mei, werden in het haardje reeds vele zieke planten waargenomen. In deze periode was het regenachtig weer, met wind uit westelijke richtingen. Bij de eerste beoordeling van het gehele veldje, welke van 28 mei–3 juni plaats had, bleek de schimmel zich voornamelijk vanuit de bron in oostelijke richting verspreid te hebben tot over een afstand van maximaal 3,50 m (fig. 10).

Stengelvlekken werden, behalve in de besmettingsbron, ook aangetroffen op een aantal andere plaatsen. Aangenomen mag worden, dat in dit stadium alle of nagenoeg alle planten met stengelvlekken gegroeid zijn uit ziek zaad. Sommige hadden reeds een klein haardje gevormd door de bladen van buurplanten te infecteren. Deze spontane haardjes werden zo goed mogelijk uitgeroeid.

Het verschijnen van planten, die vanuit het zaad ziek zijn, buiten de haard kan verklaard worden uit het feit, dat uitzoeken van gezond zaad met behulp van ultraviolet licht een zeer onvoldoende maatregel is. Uit een controleproef bleek dat nog 6% van de niet oplichtende zaden zieke planten gaf. Daar 8500 zaden werden uitgezaaid, zouden zonder antibioticum behandeling ± 500 zieke planten verwacht kunnen worden. Door behandeling met rimocidine wordt dit aantal met een factor 20 verminderd, zoals in hoofdstuk III aangetoond zal worden, zodat in de bovengenoemde proef ± 25 zieke planten verwacht konden worden. Inderdaad werd dit aantal ongeveer gevonden. Daar men deze nooit met absolute zekerheid kan uitroeien, moeten de conclusies, die we kunnen trekken uit de tweede beoordeling, die van 24–27 juni – 4 weken na de eerste – plaats vond, minder positief zijn betreffende de afstand waarover de schimmel zich in die tussentijd verspreid heeft (fig. 10).

De meeste nieuwe infecties blijken zich om, en voornamelijk aan de oostzijde van de besmettingsbron te bevinden. Daar het gewas enkele weken hierna begon af te sterven, wat de waarnemingen bemoeilijkte, is geen beoordeling meer uitgevoerd. De oogst had plaats eind juli. Het veld werd verdeeld in 112 vakjes, en de peulen van elk vakje werden apart geoogst. Per vakje werd met behulp van ultraviolet licht aan 100 zaden het percentage aantasting bepaald (fig. 11).

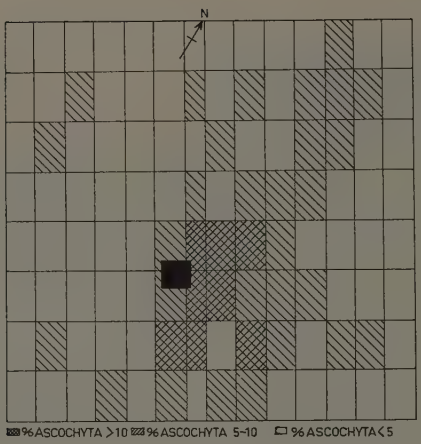


FIG. 11.
Percentages door Ascochyta pisi aangetaste zaden in de oogst van het in fig. 10 beschreven proefveldje.
Percentages of seeds attacked by Ascochyta pisi in the yield of the plot described in fig. 10.

Duidelijk is te zien dat het hoogste percentage zieke zaden aan de lijzijde van de aangebrachte besmettingsbron voorkomt. Deze grote haard heeft zich voornamelijk in noord-oostelijke richting uitgebreid en niet geleid tot een uniforme besmetting van het gehele veld. Ook uit de spontane haardjes blijkt dat de sporen slechts over kleine afstand verplaatst werden.

Begin 1956 werd de beschikking verkregen over een partij nagenoeg gezond zaad van het ras Eminent. Hiermee werden op 12 april een aantal veldjes uitgezaaid van 1 m bij 1,20 m bestaande uit 6 rijen met elk 50 zaden. Vier van deze veldjes werden uitgezaaid op zware kleigrond op het terrein van het laboratorium en 4 op zandgrond aan de Diedenweg, aan de noordzijde beschut door een boomgaard. Op 9 mei werd in alle veldjes een bloempotje ingegraven dat 1 tot 4 plantjes bevatte met rijpe pycniden van *Ascochyta pisi*. De volgende dag bracht krachtige wind met regenbuien, en hierop volgde een droge periode. Op 22 mei werden nog op geen der veldjes zieke planten aangetroffen, doch op 24 mei reeds een groot aantal, dat zich in de daarop volgende dagen nog iets uitbreidde. Deze verspreiding is in de figuren 12 en 13 met stippen aangegeven. Op 25 mei viel weer zeer veel regen, opnieuw gevolgd door een droge periode. Op 5 juni werd nog geen nieuwe verspreiding gevonden, doch van 7–9 juni werd in alle veldjes een groot aantal zieke planten waargenomen. Dit is met kruisjes weergegeven.

Toen de veldjes eind juni beoordeeld werden, bleek dat in bijna alle gevallen de verspreiding over het grootste deel van het veldje had plaats gehad, hoewel ook nu nog was waar te nemen dat de aantasting in de omgeving van de oorspronkelijke haard het grootst was. Alle veldjes werden eind juli geoogst. Bepaling van het percentage *Ascochyta pisi* had plaats na uitleggen op vochtig filtreerpapier van 100 zaden per veldje. Het percentage aantasting varieerde van 25 tot 49%.

Uit de waarnemingen in de bovengenoemde veldjes kunnen de volgende conclusies getrokken worden.

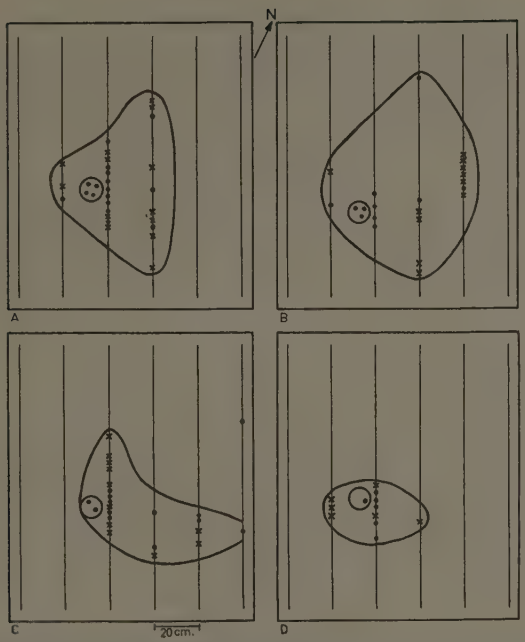


FIG. 12. Veldjes met gezonde planten (ras Eminent), ruim 1 m² groot, gelegen op een open terrein op zware kleigrond. In elk van deze veldjes is op 9 mei 1956 een bloempot geplaatst met respectievelijk 4(A), 3(B), 2(C) en 1(D) planten met sporulerende vlekken van Ascochyta pisi. Op 10 mei was er regen met harde wind, en op 25 mei regen met weinig wind. Symptomen op de omringende planten werden waargenomen op 24 mei (stippen) en omstreeks 7 juni (kruisjes).

Plots with healthy plants (variety Eminent), more than 1 m², situated in an unprotected field on heavy clay soil. Flower pots containing 4(A), 3(B), 2(C) and 1(D) plants respectively, with sporulating lesions of Ascochyta pisi, were placed in each of these plots on 9 May 1956. On 10 May there were high winds with showers and on 25 May rain with little wind. Symptoms on the surrounding plants were observed on 24 May (dots) and about 7 June (crosses).

1. De incubatietijd in deze veldproeven bedroeg na de infectie van 10 mei minimaal 13, en na de infectie van 25 mei minimaal 12 dagen. In kasproeven, bij 100% luchtvochtigheid gedurende de eerste 24 uur en een temperatuur van 20°C, bedroeg deze niet meer dan 6 dagen. Ter vergelijking worden hier enkele gegevens vermeld betreffende de temperatuur en de relatieve luchtvochtigheid in het gewas, die met behulp van thermografen en hygrografen opgenomen werden op een hoogte van 10 cm boven de grond. De temperatuurkrommen van de veldjes op de klei verschilden weinig met die van de veldjes op het zand. De maximumtemperaturen schommelden tijdens de eerste incubatieperiode om de 20°C, de minimumtemperaturen van –2 tot 7°C. Op de klei kwamen 6 dagen voor met een minimum relatieve luchtvochtigheid beneden 50%, tegen 10 op de zandgrond. Tijdens de tweede incubatieperiode lagen de maximumtemperaturen doorgaans boven 20°C, doch alleen op de 3e en 4e dag boven 25°C,

FIG. 13. Uitvoering van deze proef als beschreven onder fig. 12. Hier waren de veldjes echter beschut achter een boomgaard, en gelegen op zandgrond.

Laying out of this trial as described under fig. 12. However, in this trial the plots were protected by an orchard and situated on sandy soil.

en schommelden de minimumtemperaturen op de klei tussen 1 en 14°C, en op het zand tussen 4 en 15°C. Op de klei kwamen geen dagen meer voor met een relatieve luchtvochtigheid beneden 50%, op het zand één.

2. De verspreiding heeft plaats tijdens regenachtig weer en wordt in sterke mate beïnvloed door de richting en de kracht van de wind. Dit laatste blijkt uit de verschillen tussen de beschutte en niet beschutte veldjes, en uit de mate van verspreiding na de regen met felle wind op 10 mei in vergelijking met de verspreiding na regen met weinig wind op 25 mei (fig. 12 en fig. 13).

3. De afstand, waarover verspreiding plaats heeft gehad, was in de beschutte veldjes gemiddeld 7 en maximaal 12 cm, en die in de in het vrije veld gelegen proeven gemiddeld 20 en maximaal 65 cm.

4. De kleinste bron geeft ook de kleinste haard. In beide series zijn de haarden van de veldjes waarin slechts één ziek plantje uitgezet werd (veldjes A), kleiner dan die waarin meer zieke plantjes uitgezet werden. Verder is, zoals te verwachten was, de verspreiding geringer dan bij de in fig. 10 weergegeven grotere verspreidingsproef, waar een bron van 1 m^2 aanwezig was.

Evenals in 1955 werd ook in 1956 een grotere verspreidingsproef ingezet van $2^1/_4$ are met een *Ascochyta*-bron van 1 m^2. Dit jaar stond nagenoeg gezond zaad ter beschikking; in verband met de op dat moment geringe voorraad

antibioticum werd het zaad niet behandeld. Uitzaaien had plaats op 23 maart; op 8 mei waren in de bron 54 van de 102 planten ziek. Op 15 mei werd aan de oostzijde van de haard het eerste zieke plantje gevonden; 14 dagen later bleek verspreiding tot over een afstand van 4 meter in zuid-oostelijke richting te hebben plaats gevonden. Deze verspreiding heeft waarschijnlijk voornamelijk plaats gehad tijdens de regenbuien gepaard gaande met felle wind op 10 mei. Op 13 juni was de uitbreiding voortgeschreden tot plm. 6 meter. Ook in deze proef werden buiten de besmettingsbron nog enkele zieke planten uit aangetaste zaden aangetroffen. Sommige van deze hadden op 13 juni reeds een klein haardje gevormd. Door de zware regenval in juli kwam het proefveld in het water te liggen; beoordeling van het geoogste zaad heeft niet meer plaats gehad.

6. AANTASTING DER PEULEN EN ZADEN

Door Noll (1940) worden twee typen van peulaantasting door *Ascochyta pisi* beschreven. Het eerste bestaat uit min of meer ronde vlekken, met een dikke, opgeheven, donkere rand en een lichter ingezonken centrum met pycniden; de grootte der vlekken varieert van 3 tot 9 mm. Het tweede type onderscheidt zich van het eerste hierdoor, dat de rand niet dik, zwart of opgeheven is. Noll veronderstelt dat de twee typen door verschillende fysio's veroorzaakt zouden worden. Hij beschrijft niet of hij zijn waarnemingen deed aan nog groene, dan wel aan afgestorven peulen.

Op de nog levende groene peulen werden in onze proeven uitsluitend ingezonken, lichtbruine vlekken aangetroffen, die met een donkere rand aan de groene peuldelen grensden, doch waarvan de rand niet opgewelfd was. Pas wanneer de peul ging afsterven, begon bij het indrogen deze rand er bovenuit te steken. In de vlekken werden talrijke pycniden gevonden, vooral in het centrum: de diameter der vlekken was meestal niet meer dan 5 mm, hoewel door samenvloeiing van vlekken veel grotere peulgedeelten aangetast kunnen zijn. In op deze wijze aangetaste peulen werden meestal een of meer aangetaste zaden aangetroffen.

Deze werden echter ook vaak gevonden in peulen, die niet de bovenbeschreven symptomen bezaten. Deze peulen waren meestal geheel of gedeeltelijk overdekt met zwarte stippen, die pycniden bleken te zijn van *Ascochyta pisi*. Deze pycniden waren dus niet gelocaliseerd in het centrum van een duidelijk begrensde *Ascochyta*-vlek, doch ze waren, vaak geheel onregelmatig, verspreid over de peul. Vaak was niet eens een verkleuring van de peul waar te nemen op de plaatsen waar de pycniden zich bevonden. Tussen het vlek-type en het type van peulaantasting zonder vlekken kwamen verder alle overgangen voor, zoals bruine vlekken zonder opgewelfde donkere rand en weinig of niet verkleurde plekken, doch met de pycniden in groepsverband als in een vlek. In fig. 14, 15 en 16 worden de beide uitersten getoond.

Het type van peulaantasting zonder vlekken werd uitsluitend aangetroffen wanneer de peulen al afgestorven waren. In dat geval heeft dus geen vlek-vorming plaats, zoals dat op groene peulen het geval is. De overgangen tussen beide typen treden op als een peul geïnfecteerd wordt wanneer de afsterving reeds zover gevorderd is, dat de reactie van de plant, die normaal leidt tot een scherp

begrensde vlek, niet meer optreedt. Het is mogelijk dat dit de verklaring vormt voor het door NOLL beschreven type van aantasting, waarbij de dikke, opgewelfde donkere rand ontbreekt.

Uit het bovenstaande blijkt dat de levende plant zich ten opzichte van *Ascochyta pisi* anders gedraagt dan dood peulweefsel. In het eerste geval wordt een scherp begrensde vlek gevormd, doch in het tweede geval kan de schimmel zich ongelimiteerd uitbreiden. Hiermede in overeenstemming is de waarneming dat de schimmel, na afsterven van de peul, ook buiten de vlek kan uitgroeien en pycniden vormen. Dit is geconstateerd op peulen in het veld, alsook op afstervende peulen met vlekken, die in vochtig milieu werden weggelegd.

Niet alleen in peulen met typische *Ascochyta*-vlekken of met verspreide pycniden zonder vlekken werden aangetaste zaden aangetroffen, maar ook in sommige peulen, waarop in het geheel geen symptomen waarneembaar waren. Enkele afgestorven peulen zonder enig symptoom, afkomstig uit een veldproef waarin veel *Ascochyta pisi* voorkwam, werden uitgelegd in een vochtige petrischaal. Op twee hiervan verschenen na enkele dagen reeds pycniden van *Ascochyta pisi*. In deze peulen was dus mycelium aanwezig zonder dat ze symptomen vertoonden.

Teneinde enige quantitatieve gegevens te verkrijgen over de bovengenoemde verschijnselen, werden uit een veldproef, uitgezaaid in 1955 uit voor omstreeks 60 % aangetast Eminent zaad, ruim 500 rijpe peulen beoordeeld op het al dan niet voorkomen van symptomen van *Ascochyta pisi* en op het type van aantasting. Tevens werden de zaden uit deze peulen beoordeeld op het voorkomen van deze schimmel door uitleggen op vochtig filtreerpapier. De uitkomsten worden vermeld in tabel 10.

TABEL 10. Beoordeling van 528 peulen uit een veldproef in 1955 op type van Ascochyta aantasting, en op aantasting der zaden. Ras Eminent.

Table 10. Assessment of 528 pods, derived from the field experiments in 1955, on type of attack by Ascochyta pisi, and on infection of the seeds. Variety Eminent.

type aantasting *type of attack*	peulen *pods*		zaden *seeds*	zaden met mycelium *seeds with mycelium*	
	aantal *number*	%	aantal *number*	aantal *number*	%
pycniden in vlekken *pycnidia in spots*	138	26,1	585	156	21,5
pycniden niet in vlekken *pycnidia not in spots*	367	69,5	1655	554	76,5
geen symptomen *no symptoms*	23	4,4	90	14	2,0
totaal *total*	528	100	2330	724	100

Uit deze tabel komt de betekenis van het type peulaantasting zonder vlekken duidelijk naar voren. In deze peulen werden ongeveer evenveel aangetaste zaden aangetroffen als in de peulen met vlekken. Dit type aantasting kwam op bijna drie-kwart der peulen voor en ruim 75 % der aangetaste zaden was hieruit afkomstig.

Aangezien dit type aantasting alleen op afstervende en afgestorven peulen

FIG. 17

FIG. 18

FIG. 17. Zieke planten uit aangetast zaad, ras Eminent, met stengelvlek (links) en met vlekken op stengel en blad (midden); rechts gezonde plant.
Diseased plants from infected seed, variety Eminent, showing symptoms on the stem (left) and on the stem and the leaves (centre); right a healthy plant.

FIG. 18. In het donker opgegroeide erwteplanten uit aangetast zaad, ras Eminent. In plaats van vlekken zijn bruine strepen te zien, eveneens veroorzaakt door Ascochyta pisi.
Pea plants from attacked seeds, grown in darkness, variety Eminent. Instead of spots, brown stripes occur, also caused by Ascochyta pisi.

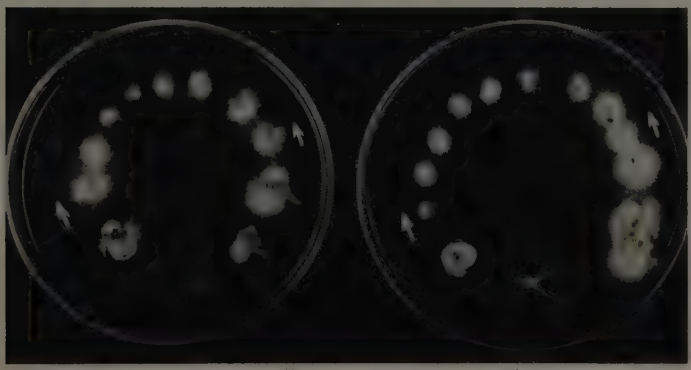


FIG. 19. Worteltje, cotyl en stengelschijfjes van aangetaste planten uitgelegd op agar. Mycelium ook op (symptoomloze) stengeldeel tussen cotylen en vlek; in foto tussen → en ←.
Rootlet, cotyledon and stem sections from infected plants laid out on agar. Mycelium occurs also on (symptomless) part of the stem between cotyledons and lesion; on photo between → and ←.

Fig. 14

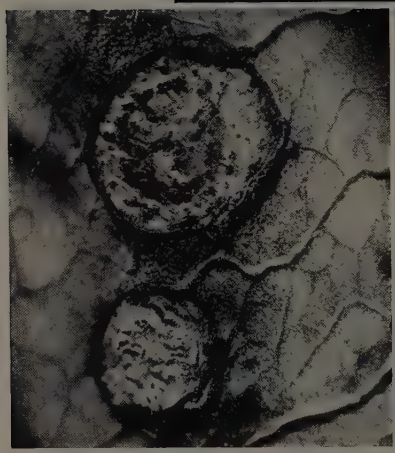


Fig. 15

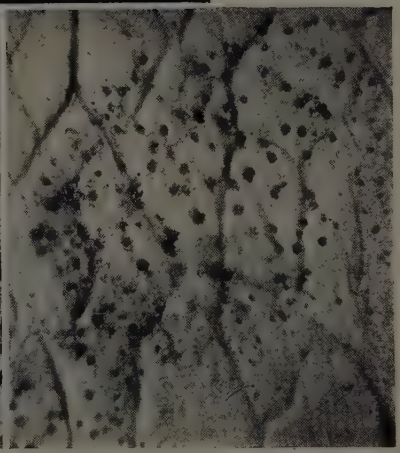


Fig. 16

Fig. 14. In het veld door Ascochyta pisi aangetaste peulen. Links: pycniden gelocaliseerd in scherp begrensde vlekken; gedeelte hiervan vergroot in fig. 15. Rechts: pycniden vrij over de peul verspreid; gedeelte hiervan vergroot in fig. 16.
Pods attacked by Ascochyta pisi in the field. Left: pycnidia localized in clearly marked spots; enlarged in fig. 15. Right: pycnidia distributed over the pods; enlarged in fig. 16.

Fig. 15. Vergroting linker deel van fig. 14.
Enlargement left part of fig. 14.

Fig. 16. Vergroting rechter deel van fig. 14.
Enlargement right part of fig. 14.

aangetroffen wordt, en zich op het geoogste nog te velde aanwezige product in belangrijke mate kan uitbreiden, volgt hieruit dat in de onderhavige proef het merendeel der zaden pas aangetast werd kort voor en na het maaien van het gewas. Nat weer tijdens deze periode zal dus zaadaantasting zeer in de hand werken. Deze redenering is in overeenstemming met de waarnemingen van JONES (1927), dat regen vlak voor de oogst van grote invloed is op de zaadaantasting, speciaal wanneer de oogst van het reeds rijpe gewas hierdoor vertraagd wordt en van RIEPMA (1955), die verschillende percentages *Ascochyta pisi* verkreeg in een op verschillende wijze geruiterd gewas.

Bij *Mycosphaerella pinodes* en *Ascochyta pinodella* werd een type van aantasting zonder vlekken geconstateerd, dat met de loupe moeilijk van dat van *Ascochyta pisi* te onderscheiden is. De aantasting door laatstgenoemde schimmel bleek echter bij microscopisch onderzoek verreweg te overwegen, zodat correctie het algemene beeld niet sterk zou wijzigen.

7. AANTASTING DER ZADEN DOOR MYCELIUM UIT PLANTEN ZONDER SYMPTOMEN

Hierboven is beschreven hoe zieke zaden aanwezig kunnen zijn in peulen zonder symptomen, waarbij gedacht is aan een late infectie van de peul, die niet meer leidt tot vlekvorming of fructificatie. Daarnaast waren er ook waarnemingen, die er op wezen, dat zaadaantasting plaats kan hebben door mycelium, dat reeds vanaf het jeugdstadium in de plant aanwezig is en langs interne weg de zaden bereikt. Een eerste aanwijzing hiervoor werd gevonden in een kasproef, waaruit een aantal bijna rijpe, doch nog groene peulen geplukt werd, die geen symptomen vertoonden. Uit enkele zaden hiervan kon desniettemin *Ascochyta pisi* geïsoleerd worden. Bovendien is in hoofdstuk I, 4C aangetoond dat mycelium tot in de top van de plant aanwezig kan zijn zonder dat deze symptomen vertoont. Om na te gaan of aantasting op bovengenoemde wijze kan plaats vinden, zijn een aantal proeven genomen, waarbij planten uit ziek zaad werden opgekweekt in Mitscherlichpotten; toediening van water geschiedde via een in het midden van de pot staande trechter, zodat geen verspreiding der ziekte door spattende druppels kon plaats vinden. Uit een proef bestaande uit 10 potten met elk 20 aangetaste Eminent zaden werden 521 zaden geoogst uit bijna rijpe doch nog groene peulen. Op geen van deze peulen waren symptomen waar te nemen. Niettemin kon, na uitwendig ontsmetten der zaden en uitleggen op vochtig filtreerpapier, uit één van deze zaden *Ascochyta pisi* geïsoleerd worden.

Om elke mogelijkheid tot aantasting der peulen van buitenaf geheel uit te sluiten, werd een proef uitgevoerd met 18 potten, elk 28 aangetaste zaden bevattende, waaruit alle zieke planten onmiddellijk na het zichtbaar worden der symptomen verwijderd werden. Het gieten geschiedde ook hier in een trechter. Gedurende het verdere groeiseizoen tot aan de oogst, werden noch op de planten, noch op de peulen symptomen van *Ascochyta pisi* aangetroffen. Het aantal geoogste zaden bedroeg 418. Deze werden alle uitgelegd op vochtig filtreerpapier. Na 10 dagen, de normale beoordelingstijd, bleek echter op nog geen der zaden schimmelmycelium te groeien. Bij een tweede beoordeling 10 dagen later werden echter enkele erwten aangetroffen met enig schimmelmycelium. Uit 2 hiervan kon *Ascochyta pisi* geïsoleerd worden. Hiermee is aangetoond dat in

een uiterlijk gezonde peul van een plant zonder *Ascochyta*-symptomen, zaad aangetroffen kon worden, dat geïnfecteerd is door mycelium, dat uit deze plant afkomstig is. Uit deze en de reeds eerder vermelde waarnemingen betreffende symptoomloze planten moet de uitermate interessante conclusie getrokken worden, dat de erwteplant in sommige gevallen drager kan zijn van *Ascochyta* zonder dat dit op enigerlei wijze aan de plant en zijn delen is te zien.

8. BESPREKING

Met behulp van de gegevens uit de veldproeven is het mogelijk een globale berekening uit te voeren betreffende het effect van zaaizaadaantasting op het percentage aantasting in het geoogste product.

In de veldproeven, uitgevoerd in 1955 en 1956, groeiden uit gemiddeld 23% der aangetaste zaden zieke planten. Vanuit deze planten verspreidde de schimmel zich voornamelijk door spattende regendruppels over de omringende planten. De verspreiding had niet over grote afstand plaats; zelfs bij harde wind met regen verplaatsten de sporen zich vanuit een bron, bestaande uit 1–4 zieke planten, in één vlucht doorgaans over niet meer dan enkele tientallen centimeters. Door een dergelijke bron in veldjes van 1 m^2 met gezonde planten te plaatsen, werden percentages aangetast zaad verkregen van 25–50%. Eén zieke plant met goed sporulerende vlekken kan dus in een voor de schimmel gunstig seizoen minstens 1 m^2 zwaar besmetten. Vermoedelijk is dit ook niet zo heel veel meer, daar ook aan het einde van het groeiseizoen de schimmel zich doorgaans nog niet uniform over het veldje verspreid had, en een haard nog duidelijk waarneembaar was. Stellen we derhalve het door één zieke plant besmette oppervlak op 1 à 2 m^2, en nemen we aan dat de vanuit-het-zaad zieke planten regelmatig over het veld verspreid zijn, dan zouden er per ha 5 à 10.000 zieke planten nodig zijn om een zware aantasting te veroorzaken. Aannemende dat $\pm$ 25% der zieke zaden een ziek plantje geeft, dan komt dit dus neer op 20 à 40.000 aangetaste zaden in het zaaizaad voor één ha. Bij gebruik van 200 kg zaaizaad met 4.000 zaden per kg, betekent dit een percentage van 2½–5%. Dit wil dus zeggen, dat bij het ras Eminent in een voor de schimmel gunstig seizoen, een percentage van 2½–5% *Ascochyta pisi* in het zaaizaad, reeds voldoende is om over het gehele veld een zware aantasting teweeg te brengen, welke resulteert in een zaadaantasting van 20–50%. Wanneer het gewas na de oogst ten gevolge van regenachtig weer nog lang te velde moet vertoeven, zal een zo hoge aantasting mogelijk al bereikt kunnen worden met een percentage ziek zaaizaad, dat nog kleiner is dan 2½%. Daartegenover staat, dat in een droog seizoen ook een betrekkelijk hoog percentage *Ascochyta* in het zaaizaad weinig schade zal veroorzaken.

Wanneer in kasproeven zaad uitgezaaid werd dat voor 100% aangetast was, kwam ongeveer één derde deel der zaden niet op, gaf één derde deel zieke planten en één derde deel gezonde planten. Wanneer evenwel de zaadhuid vóór het uitzaaien werd verwijderd, was het aantal zieke planten drie- tot viermaal zo klein. Hieruit kan de conclusie getrokken worden dat de meeste zieke planten uit kiempjes groeien, die pas na het zaaien door mycelium vanuit de zaadhuid geïnfecteerd zijn. Hoewel de schimmel bij 80% der aangetaste zaden in de coty-

len, en bij ruim 40% in het kiempje aangetroffen werd, is dit dieper gelegen mycelium dus van minder betekenis voor het ontstaan van zieke planten dan het mycelium dat in de zaadhuid gelocaliseerd is. Vele van de zwaar aangetaste zaden komen namelijk niet op.

Uit het onderzoek is verder gebleken, dat *Ascochyta pisi*, een veroorzaker van vlekkenziekte op erwten, in het geheel niet tot deze vlekken beperkt is. Dit geldt in de eerste plaats voor planten, die uit zieke zaden gegroeid zijn. Veelvuldig kon de schimmel bij deze planten geïsoleerd worden uit stengeldelen, waarop geen symptomen waar te nemen waren, en zelfs uit geheel symptoomloze planten. Sommige van deze laatste waren zelfs in staat aangetaste zaden te leveren, waarbij we moeten aannemen, dat de aantasting van deze zaden plaats gehad heeft door mycelium, dat gedurende de gehele groeiperiode inwendig in de plant aanwezig is gebleven, en tenslotte via de zaadstreng het zaad bereikt heeft.

Het niet gebonden zijn van de schimmel aan de karakteristieke vlekken kwam verder tot uiting op de peulen tijdens de afrijping. *Ascochyta pisi* kon dan algemeen uit weefsel buiten de vlekken geïsoleerd worden. Ook met het blote oog was de schimmel op deze plaatsen doorgaans waar te nemen, en wel in de vorm van pycniden, die verspreid over de gehele peul voorkwamen. In de veldproeven bleek dit type aantasting zonder vlekken te domineren over het bekende vlektype. Het verschijnen van het type zonder vlekken voornamelijk tijdens en na het afsterven van het gewas, houdt in, dat in die periode de meeste zaadaantasting plaats had. De weersomstandigheden kort voor, tijdens en na de oogst en de behandeling van het geoogste, nog te velde aanwezige gewas, kunnen in verband hiermee van doorslaggevend belang geacht worden voor de mate van zaadaantasting. Ook in peulen zonder symptomen werden aangetaste zaden aangetroffen. In verband hiermee moet het onmogelijk geacht worden gezond zaad te verkrijgen alleen door uitzoeken van peulen zonder symptomen. Dit geldt ook voor *Mycosphaerella pinodes* en *Ascochyta pinodella*.

Het percentage zieke planten uit aangetaste zaden van één partij zaaizaad kan sterk schommelen (I, 4). Vooral in de winter lag het aan de lage kant, doch soms ook in de zomer. Het lijkt aannemelijk, dat in de winter o.a. de geringe hoeveelheid licht een rol speelt, en in de zomer de somstijds voorkomende hoge grondtemperaturen. In het laatste geval hebben de nog niet aangetaste kiempjes vermoedelijk een grotere kans aan een infectie door mycelium vanuit de andere delen van het zaad te ontsnappen dan bij temperaturen, waarbij het kiempje minder snel groeit. Minder duidelijk is echter de invloed van de belichting op het aantal zieke planten. Het is niet denkbaar, dat de kiemaantasting vóór de opkomst erdoor beïnvloed wordt. Derhalve moeten we aannemen, dat onvoldoende licht een ongunstige invloed uitoefent op het mee naar boven groeien van het mycelium in de stengel, mogelijk tengevolge van een snellere lengtegroei van de stengel, óf het ontstaan van symptomen belemmert. Verder rijst de vraag waarom, bij aanwezigheid van de schimmel in grote delen van de stengel, de symptomen alléén op een bepaalde plaats, of soms in het geheel niet verschijnen. In het laatste geval kan gedacht worden aan sterk verzwakte stammen. Doch een uit een symptoomloze plant geïsoleerde stam van *Ascochyta pisi* bleek na inoculatie gezonde planten evengoed te kunnen aantasten als een stam, geïsoleerd uit een plant met symptomen. Wel werd geconstateerd, dat bij uitleggen op kersagar de schimmel minder snel uit symptoomloze plantendelen of zaden groeide dan uit planten met symptomen.

Bij anatomisch onderzoek bleek, dat in deze gevallen slechts zeer weinig mycelium aanwezig was, hetgeen de vraag oproept, waarom op bepaalde plaatsen of bij bepaalde planten dan zo weinig mycelium aanwezig is. Mogelijk wordt dit bepaald door de physiologische gesteldheid van de plant, of van onderdelen van de plant, en door het licht dat hierop via de stofwisseling invloed uitoefent. Hiervoor pleit de omstandigheid, dat minder zieke planten verschijnen bij gedempt licht, en dat op stengeldelen, die zich onder de grond bevinden nooit symptomen verschijnen. Dit komt ook duidelijk tot uiting, wanneer wij zieke planten uit diep en ondiep gezaaid zaad met elkaar vergelijken: in het eerste geval blijft het ondergrondse stengeldeel, hoe lang dit ook is, steeds vrij van vlekken, doch in het tweede geval kunnen de vlekken zelfs tot bij de cotylen voorkomen.

HOOFDSTUK II

ENKELE EIGENSCHAPPEN VAN RIMOCIDINE EN PIMARICINE

1. INLEIDING

In 1954 werd een aantal cultures van schimmels en bacteriën (waaronder streptomyceten) onderzocht op antibioticumproductie. Eén hiervan, *Streptomyces rimosus*, afkomstig van het Centraal Bureau voor Schimmelcultures te Baarn, bleek sterk antagonistisch te werken ten opzichte van een groot aantal schimmels, waaronder *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes* en *Ascochyta pinodella* (fig. 22). Wanneer men deze streptomyceet op een petrischaal ent, wordt een antibioticum met fungicide eigenschappen geproduceerd, dat in de agar diffundeert. Omtrent de snelheid, waarmee dit plaats heeft, geeft de volgende proef een indruk. In het centrum van een petrischaal met havermoutagar werd *Streptomyces rimosus* geënt; op verschillende tijdstippen na het enten werden op 1, 2, 3 en 4 cm afstand van het centrum stukjes uitgeponst, en gebracht op een petrischaal met sporen van *Aspergillus niger* VAN TIEGH. Ook op het eind van de proef vielen alle ponsstukjes nog buiten de kolonie van de streptomyceet. De door deze ponsstukjes veroorzaakte remmingszones werden gemeten (tab. 11). Genoteerd is het verschil in diameter tussen de remmingszone en het ponsstukje.

TABEL 11. Diffusie van antibioticum vanuit een culture van Streptomyces rimosus in de omringende agar; op verschillende tijdstippen na enting zijn op 1, 2, 3 en 4 cm afstand van het centrum van de cultuur stukjes agar uitgeponst, en de hierdoor in Aspergillus niger veroorzaakte remmingszones gemeten.

Table 11. Diffusion of rimocidin from a culture of Streptomyces rimosus into the surrounding agar; pieces of agar were punched at a distance of 1, 2, 3 and 4 cm from the centre of the culture at different times after inoculation, and their inhibiting effect on Aspergillus niger was measured.

tijdstip na enting *days after inoculation*	afstand ponsstukje tot Strept. rimosus *distance of punched piece from Strept. rimosus*			
	1 cm	2 cm	3 cm	4 cm
	remmingszone (mm) *inhibition zone (mm)*	remmingszone (mm) *inhibition zone (mm)*	remmingszone (mm) *inhibition zone (mm)*	remmingszone (mm) *inhibition zone (mm)*
2 dagen / *days*	0	0	0	0
3 „	6	0	0	0
5 „	16	0	0	0
7 „	15	1	0	0
9 „	14	9	0	0
11 „	17	9	2	0
14 „	19	12	8	3
16 „	20	13	8	2
19 „	18	12	8	6
26 „	20	13	10	8

Na 3 dagen is het antibioticum dus reeds op 1 cm afstand van de streptomyceet aantoonbaar, en na 14 dagen op een afstand van 4 cm, d.w.z. over de gehele petrischaal.

Vervolgens is getracht de cultuur van *Streptomyces rimosus* met het in de agar gediffundeerde antibioticum dienstbaar te maken aan de ontsmetting van door *Ascochyta pisi* aangetaste erwtezaden. Hiertoe werd deze streptomyceet uitgestreken op een petrischaal met havermoutagar en gedurende ruim een week geweekt bij 23 °C. Daarna werd de gehele cultuur met voedingsbodem en al, onder toevoeging van $\pm$ 25 cm^3 water, fijngemaakt in een Waringblendor; in de op deze wijze verkregen breiachtige massa werden door *Ascochyta pisi* aangetaste erwtezaden geweekt, en na afspoelen met water uitgelegd op vochtig filtreerpapier. Het percentage zaden, waarop na een week mycelium was gegroeid, is weergegeven in tabel 12.

TABEL 12. Effect van weken der zaden gedurende 18 uur in een cultuursuspensie van Streptomyces rimosus. Filtreerpapier-toets.
Table 12. Effect of soaking the seeds in a culture suspension of Streptomyces rimosus for 18 hours. Filter paper test.

ras *variety*	geweekt in: *soaked in:*	aantal zaden *number of seeds*	% Ascochyta pisi
Eminent	suspensie/*suspension*	120	85
Eminent	water	120	77
Servo	suspensie/*suspension*	200	6
Servo	water	200	60

De cultuursuspensie van *Streptomyces rimosus* blijkt dus een sterke werking te hebben tegen *Ascochyta pisi* in het zaad. Bovendien was de genoemde behandeling niet schadelijk voor de kieming der zaden. Derhalve leek het de moeite waard een nader onderzoek in te stellen naar het antibioticum, dat in de cultuursuspensie van deze streptomyceet aanwezig moest zijn.

Uit de literatuur bleek, dat *Streptomyces rimosus* ten minste 2 antibiotica vormt, nl. oxytetracycline, dat als bactericide bekendheid in de geneeskunde verworven heeft, en waarmee ook reeds vele proeven tegen planteziekten genomen zijn, en rimocidine, dat in 1951 ontdekt is op de laboratoria van de farmaceutische industrie Chas. Pfizer and Co., Inc. te New York (DAVISSON c.s. 1951), en waarvan werking tegen enige huidschimmels aangetoond is. Oxytetracycline bleek in onze proeven noch in vitro noch in vivo enig effect tegen *Ascochyta pisi* te bezitten. Doch rimocidine, dat door de firma Pfizer ter beschikking gesteld werd, bleek zeer actief tegen deze schimmel te zijn, zowel in vitro als in het zaad. Daar de werking in alle opzichten te vergelijken was met die van de ruwe cultuursuspensie zijn de proeven dan ook uitsluitend met rimocidinepreparaten van Pfizer voortgezet.

Tijdens een verblijf aan de afdeling voor antibioticum onderzoek van het „Centre National de Recherches Agronomiques" te Versailles, is aangetoond, dat de tegen *Ascochyta pisi* werkzame stof in de ruwe cultuursuspensie volgens papierchromatografische weg niet van rimocidine was te onderscheiden, en dat ook het absorptiespectrum in het ultraviolet van beide gelijk was. Ook na polarografisch en electroforetisch onderzoek traden geen verschillen aan het licht.

Mede op grond hiervan is aangenomen dat het fungicide bestanddeel in de cultuursuspensie gelijk was aan rimocidine.

Volgens mededeling van de firma Pfizer is rimocidine-sulfaat matig oplosbaar in de lagere alcoholen en weinig in water. In onze proeven werden in dit opzicht weinig moeilijkheden ondervonden, wanneer rimocidine-sulfaat in water verwarmd werd tot 80°C en daarna gedurende enige tijd geroerd. Op deze wijze kon de voor ontsmetting benodigde concentratie van 100 p.p.m. gemakkelijk bereikt worden. Het werkte niet tegen bacteriën, doch wel tegen een groot aantal schimmels (II, 3). Verder bleek dat de fungicide werking van een oplossing sterk terugliep in daglicht, hetgeen samen bleek te hangen met de stereoisomere configuratie van de tetraëengroep (II, 4).

Omtrent het effect van rimocidine op planten en planteziekten was bij het begin van het onderzoek nog nagenoeg geen literatuur verschenen. BONDE (1953) vond, dat Na-rimocidine de conidiënvorming bij *Phytophthora infestans* (MONT.) DE BARY eerder schijnt te bevorderen dan te verhinderen. Spuiten met rimocidine tegen fireblight, *Erwinia amylovora* (BURRILL) WINSLOW & al., op appelbomen had geen effect (HEUBERGER & POULOS, 1953). HILBORN (1953) diende een groot aantal antibiotica gedurende 10 dagen in waterige oplossing aan de grond toe. Hij deelt mede dat de meeste hiervan, o.a. rimocidine, wel enig effect hadden tegen *Rhizoctonia* bij sla en tomaten, tegen *Verticillium* bij tomaten en tegen beide schimmels op aardappelstengels. Tijdens het onderzoek werd kennis genomen van de volgende literatuur. Bespuiting van tabak met rimocidine tegen *Peronospora tabacina* ADAM had weinig resultaat (GROSSO, 1954). Behandeling van de zaden van *Pinus banksiana* en *Betula verrucosa* gaven goede bestrijding van *Rhizoctonia solani* KÜHN en *Pythium* species (VAARTAJA, 1954, 1956a). WAGGONER (1956) vond, dat streptomycinebehandeling van schijfjes aardappel tegen bacterieaantasting, de groei van *Fusarium* bevorderde, doch dat deze schimmelaantasting met rimocidine onderdrukt kon worden. Verder had rimocidine effect tegen rot in geoogste perziken, veroorzaakt door *Sclerotinia fructicola* (WINT.) REHM en *Rhizopus nigricans* EHRENB. (SMITH, MC CLURE & HALLER, 1954.)

BARTON & MC NAB (1954) gingen de invloed na van een aantal antibiotica, waaronder rimocidine op de wortelgroei van tarwezaailingen en VAARTAJA (1956b) vond, dat rimocidine de kieming van zaden van *Betula verrucosa* niet nadelig beïnvloedde.

Te Wageningen is het effect van rimocidine op inwendig door schimmels aangetaste zaden onderzocht; de werking tegen *Ascochyta pisi* in erwtezaden zal besproken worden in hoofdstuk III. Verder had dit antibioticum een intern ontsmettende werking tegen *Colletotrichum lindemuthianum* (SACC. & MAGN) BRI. & CAV. in bonezaden, *Stemphylium radicinum* (MEIER, DRECHSL. & EDDY) NEERG. in wortelzaad en *Phoma betae* (OUDEM.) FRANK in bietezaad.

Ongeveer anderhalf jaar nadat de proefnemingen met rimocidine waren begonnen, werd door bemiddeling van Dr. Th. VAN EEK van de Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N.V. een door deze industrie nieuw ontwikkeld antibioticum ontvangen, waaraan de naam pimaricine gegeven is. Dit antibioticum werd gewonnen uit *Streptomyces natalensis*[1]), aangetroffen in een

[1]) Ned. Octrooiaanvrage 205.345.

grondmonster uit Pieter Maritzburg in Zuid-Afrika. Het antibioticum had een sterke fungicide werking, doch had geen effect tegen bacteriën. De oplosbaarheid in lagere alcoholen en in water is gering; het lost tot 60 p.p.m. op in aqua destillata, maar bij verwarming kan de concentratie opgevoerd worden. Het natriumzout van pimaricine is tot 6% in water oplosbaar, maar slaat na enige tijd weer neer. Behalve tegen *Ascochyta pisi* in erwtezaden (hoofdstuk III), had het ook een goede ontsmettende werking tegen *Botrytis cinerea* PERS. EX FR. in vlaszaad (V. D. SPEK, mond. med.) en *Phoma betae* (OUDEM.) FRANK in bietezaad.

Bij toediening van rimocidine of pimaricine aan de intacte wortels van stambonen en tuinbonen konden deze antibiotica na een etmaal uit de bladeren worden geëxtraheerd. Dit onderzoek zal elders gepubliceerd worden.

2. MATERIAAL EN METHODIEK

In de proeven, beschreven in dit hoofdstuk, is gebruik gemaakt van zuiver rimocidine-sulfaat, verschaft door Chas. Pfizer & Co., Inc. te New York, en van zuiver pimaricine van de Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N.V. te Delft.

De fungicide activiteit van de antibioticumoplossingen werd getoetst ten opzichte van een voor het antibioticum gevoelige schimmel. Hiervoor werd *Aspergillus niger* gekozen, daar deze schimmel zo snel groeit, dat de resultaten reeds na één dag afgelezen kunnen worden. In een petrischaal met een vlakke bodem werd 10 cm^3 van een vloeistof gegoten, bestaande uit gelijke delen verwarmde aardappelglucose-agar, bereid uit 200 gram aardappelen + 20 gram saccharose + 25 gram agar per liter water, en een waterige sporensuspensie, ± 1 millioen sporen per cm^3 bevattend. Een bepaalde hoeveelheid van de te toetsen antibioticumoplossing werd met behulp van een micropipet op ronde schijfjes filtreerpapier met een diameter van 9 mm gebracht. Na verdampen van het oplosmiddel, gewoonlijk methanol, werden de schijfjes gelegd op petrischalen waarop *Aspergillus niger* was geënt. Nadat de schalen een etmaal in een thermostaat bij 23°C gestaan hadden, werd de door het antibioticum veroorzaakte remmingszone gemeten. Genoteerd is steeds de diameter van de remmingscirkel, verminderd met die van het schijfje filtreerpapier. Deze remmingszones werden vergeleken met die, teweeggebracht door bekende hoeveelheden antibioticum.

Op analoge wijze werd het effect van een bekende hoeveelheid antibioticum ten opzichte van andere schimmels nagegaan. Als een nadeel van deze methode geldt, dat de grootte van de remmingszone niet alleen bepaald wordt door de fungicide werking van het antibioticum, doch ook door de mate, waarin het antibioticum in de agar diffundeert. Teneinde dit bezwaar te ondervangen, kan men het antibioticum door de agar mengen, en de sporen op de agar aanbrengen. Hiertoe werd 5 cc van de bovengenoemde aardappelglucose-agar per reageerbuis gebruikt, waaraan 5 cc water toegevoegd werd met het dubbele van de gewenste antibioticumconcentratie. Na menging werd hiervan 5 cc in een volgende buis met agar overgebracht zodat op deze wijze een verdunningsreeks van het antibioticum ontstond. Op de gestolde agar werd een druppel sporensuspensie gebracht, waarna de buizen bij 23°C werden geplaatst. Op deze wijze

is nagegaan bij welke concentratie de sporen juist niet meer wilden kiemen. Op gelijke wijze is ook bepaald, bij welke concentratie geen myceliumgroei meer mogelijk is. Bij deze laatste proef zijn echter petrischalen gebruikt in plaats van reageerbuizen, daar op deze wijze ook de diameter van de schimmelkolonies gemeten kan worden.

3. FUNGICIDE WERKING

Bij toetsing van rimocidine tegen een groot aantal schimmels en bacteriën, werden alle schimmels en geen der bacteriën geremd. De conidiënkieming van alle getoetste, hieronder genoemde schimmels werd verhinderd bij een rimocidine-concentratie van 6 p.p.m. of lager: *Alternaria solani* (ELLIS & MARTIN) SORAUER, *Ascochyta pisi* LIB., *Ascochyta pinodella* JONES, *Aspergillus niger* VAN TIEGH., *Botrytis allii* MUNN., *Cladosporium cucumerinum* ELLIS & ARTH., *Colletotrichum lagenarium* (PASS.) ELLIS & HALST., *Colletotrichum lindemuthianum* (SACC. & MAGN.) BRI & CAV., *Endothia parasitica* (MURR.) ANDERSON & ANDERSON, *Glomerella cingulata* (STONEM.) SPAULD & SCHRENK, *Mycosphaerella pinodes* (BERK. & BLOX) VESTERGR., *Monilia fructigena* (PERS. EX FR.) WESTEND., *Penicillium italicum* WEHMER, *Phoma betae* (OUDEM.) FRANK, *Phoma lingam* (TODE EX FR.) DESM., en *Pythium megalacanthum* DE BARY. Ook de spruitconidiën van *Ustilago nuda* (JENS.) ROSTR. en *U. zeae* (PERS.) ROSTR. werden verhinderd te kiemen bij een concentratie van 6 p.p.m. Bij de volgende schimmels werd de myceliumgroei verhinderd bij een concentratie van 50 p.p.m. of minder in de agar: *A scochyta pisi* LIB., *Ascochyta pinodella* JONES, *Fusarium oxysporum f. pisi* (LINF.) SN. & H., F. *ox. f. lycopersici* (SACC.) SN. & H., *F. ox. f. callistephi* (BEACH) SN. & H., *F. ox. f. lupini* SN. & H., *Mycosphaerella pinodes* (BERK. & BLOX) VESTERGR., *Sclerotium bataticola* TAUB., *Sclerotium rolfsii* SACC. *Schizophyllum commune* FR. en *Stereum purpureum* (PERS. EX FR.) FR. Bij *Corticium solani* (PRILL. & DELACR.) BOURD. & GALZ. en *Sclerotium cepivorum* BERK. trad nog wel enige groei op bij 50 p.p.m., maar niet meer bij 100 p.p.m.

De fungicide werking van rimocidine en pimaricine is meer gedetailleerd onderzocht ten opzichte van *Ascochyta pisi*, en de nauw daarmee verwante schimmels *Ascochyta pinodella* en *Mycosphaerella pinodes*.

Remmming van de conidiënkieming van deze drie schimmels werd onderzocht door ronde schijfjes filtreerpapier met antibioticum te brengen op petrischalen met aardappelglucose-agar, waardoorheen sporen van de betreffende schimmel gemengd werden. Ter vergelijking werd *Aspergillus niger* gebruikt. De diameter der remmingszones werd gemeten na 3 dagen. De proef is uitgevoerd in duplo; de gemiddelden der duplo's, welke weinig uiteenliepen zijn vermeld in tabel 13.

Bij alle 4 schimmels geeft pimaricine grotere remmingszones dan rimocidine; *Ascochyta pisi* blijkt voor beide antibiotica iets gevoeliger te zijn dan de andere schimmels.

Ook is de remming onderzocht van de sporenkieming op agar, waardoorheen antibioticum van verschillende concentraties was gemengd. In deze proef zijn twee stammen van *Ascochyta pisi* getoetst, nl. een op havermoutagar sterk sporulerende en weinig luchtmycelium vormende stam (A), en een weinig sporulerende, veel luchtmycelium ontwikkelende stam (B) (tab. 14).

TABEL 13. Remming van de sporenkieming door verschillende hoeveelheden rimocidine-sulfaat en pimaricine. Diameter remmingszone verminderd met diameter schijfje (mm).

Table 13. Inhibition of spore germination by different quantities of rimocidin sulphate or pimaricin. Diameter of inhibition zone diminished by diameter of disc (mm).

	rimocidine-sulfaat γ per schijfje/γ *per disc*				pimaricine γ per schijfje/γ *per disc*			
	5	10	20	50	5	10	20	50
Ascochyta pisi	9,5	13,5	18,5	22	14,5	17,5	22,5	27,5
Mycosphaerella pinodes . .	7,5	13,5	18	22	13,5	16	21	24,5
Ascochyta pinodella	6	11	16,5	22,5	11	15	19,5	25
Aspergillus niger	8	11	14,5	17	11,5	14,5	18	20,5

TABEL 14. Sporenkieming in reageerbuizen met agar, waardoorheen verschillende concentraties antibioticum zijn gemengd.

Table 14. Germination of spores in test tubes containing agar, mixed with different concentrations of antibiotics.

	rimocidine-sulfaat (p.p.m.)							pimaricine (p.p.m.)						
	0	0.8	1.6	3.1	6.2	12.5	25	0	0.8	1.6	3.1	6.2	12.5	25
Ascochyta pisi (A)	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–
Ascochyta pisi (B)	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–
Mycosphaerella pinodes	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–
Ascochyta pinodella . . .	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–

Bij deze methode komt pimaricine wat *Ascochyta pisi* betreft iets ongunstiger voor de dag dan rimocidine in tegenstelling tot de eerste proef. Ook hier blijkt *Ascochyta pisi* iets gevoeliger dan de beide andere schimmels, althans voor rimocidine. De beide stammen van *Ascochyta pisi* reageren gelijk.

De remming van de myceliumgroei is onderzocht in petrischalen met aardappelglucose-agar, waardoorheen verschillende concentraties antibioticum gemengd waren. In het midden werd een stukje jong, in groei verkerend mycelium geënt. Na 11 dagen werden de diameters der kolonies gemeten (tabel 15, fig. 23).

TABEL 15. Diameter in mm van 11 dagen oude schimmelkolonies op agar, waardoorheen verschillende concentraties antibioticum gemengd zijn.

Table 15. Diameter in mm of fungus cultures on agar, mixed with different concentrations of antibiotics, measured after 11 days.

	rimocidine-sulfaat (p.p.m.)							pimaricine (p.p.m.)					
	0	1.5	3.1	6.2	12.5	25	50	1.5	3.1	6.2	12.5	25	50
Ascochyta pisi (A) . .	47	46	27	18	14	+	0	50	52	50	24	11	0
Ascochyta pisi (B) . .	66	50	50	27	16	+	0	71	68	62	42	22	0
Mycosphaerella pinodes	57	45	38	29	25	7	0	49	42	37	26	21	0
Ascochyta pinodella . .	59	46	42	26	20	7	0	56	59	55	38	24	0

Bij menging van het antibioticum door de agar blijkt rimocidine dus de myceliumgroei iets sterker te remmen dan pimaricine. Ook hier is *Ascochyta pisi* ten opzichte van beide antibiotica gevoeliger dan de andere getoetste schimmels.

4. STRUCTUUR EN STABILITEIT

In rimocidine werd door DAVISSON e.a. (1951) aangetroffen: C 57,65; H 7,82; N 1,81; S 2,03. Het bevat zowel zure als basische groepen. De structuur is nog niet bekend, doch wel is reeds gevonden, dat het, op grond van het absorptiespectrum in het ultraviolet, behoort tot de polyenen, waartoe ook de volgende antibiotica gerekend worden: antimycoïne, fungicidine (= nystatine), chromine (LECHEVALIER, 1953, OROSHNIK e.a., 1955), flavacide, candidine, candicidine, trichomycine, ascosine, fumagilline (OROSHNIK e.a., 1955), filipine (GOTTLIEB e.a., 1955) en fungi-chromine (TYTELL & MC CARTHY, 1955). Alle genoemde antibiotica bezitten een uitgesproken fungicide activiteit, en hebben geen of nagenoeg geen bactericide werking. Deze polyeen-antibiotica kunnen nog onderverdeeld worden naar het aantal geconjugeerde dubbele bindingen, dat ze bezitten. Rimocidine, nystatine, chromine, en antimycoïne bezitten er vier; het zijn dus tetraënen. Hiertoe moet ook pimaricine gerekend worden op grond van het absorptiespectrum in het ultraviolet. Een duidelijk verschil tussen rimocidine en pimaricine komt naar voren bij het papierchromatografisch onderzoek (fig. 20).

Bij onderzoek naar de houdbaarheid van rimocidine in oplossing werd gevonden, dat een duidelijke achteruitgang van de fungicide werking plaats had, wanneer de oplossing bij daglicht bewaard werd; in het donker echter was na 10 dagen nog geen noemenswaardige inactivering opgetreden. De oplossing stond in beide gevallen bij kamertemperatuur. Deze gegevens werden verkregen uit de volgende proef. Een oplossing van rimocidine in methanol, 1000 p.p.m., werd gedurende 1, 3, 5, 7 en 10 dagen weggezet bij kamertemperatuur in het donker, respectievelijk op een voor zonlicht toegankelijke plaats. Daarna werden van elk object hoeveelheden van 50, 20, 15, 10 en 5γ gebracht op schijfjes filtreerpapier van 9 mm diameter, die uitgelegd werden op een voedingsbodem,

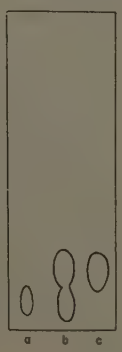


FIG. 20. Papierchromatogram van rimocidine-sulfaat (c), pimaricine-sulfaat (a) en een combinatie van beide (b); elutiemiddel propanol-water 7: 30, elutieduur 25 uur.

Paper chromatogram of rimocidin sulphate (c), pimaricin sulphate (a) and a combination of both (b); solvent propanol-water 7: 30, running time 25 hours.

waarop sporen van *Aspergillus niger* uitgezaaid waren. De remmingszones werden vergeleken met die van dezelfde hoeveelheden „verse" rimodicine oplossing (fig. 24). Hieruit kwam duidelijk naar voren, dat het antibioticum in het donker zijn activiteit behoudt, doch dat in het licht een sterke achteruitgang van de fungicide werking plaats heeft; na 10 dagen is niet meer dan ± 15% van de oorspronkelijke activiteit overgebleven.

Verder bleek, dat ook de intensiteit van het licht invloed heeft. Van een rimocidineoplossing in methanol van 1000 p.p.m. werd een deel gedurende 6 uur bewaard in een hoek van de kamer, waar geen direct zonlicht doordrong, en een deel in de vensterbank in het zonlicht. Gedurende deze tijd scheen de zon ± 4 uur. Daarna werden van elk der beide objecten 2½, 5 en 10 mm³ oplossing op een schijfje filtreerpapier gebracht, en uitgelegd op een petrischaal met sporen van *Aspergillus niger*; de remmingszones zijn na 1 dag opgemeten (tab. 16).

TABEL 16. Invloed van de lichtintensiteit op de inactivering van rimocidine-sulfaat, 1000 p.p.m. in methanol. Sporenkieming Aspergillus niger. Diameter remmingszone verminderd met diameter schijfje (mm).

Table 16. Influence of light intensity on the inactivation of rimocidin sulphate, 1000 p.p.m. in methanol. Spore germination Aspergillus niger. Diameter inhibition zone minus diameter filter paper disc (mm).

6 uur bewaard: *stored for 6 hours:*	hoeveelheid rimocidine oplossing per schijfje *quantity of rimocidin solution per disc*		
	2½ mm³	5 mm³	10 mm³
in zonlicht *under sunlight* . . .	0	2½	7
in de schaduw *in the shadow* . . .	3½	6	8½
vers *not stored*	3	6	9½

De fungicide activiteit van de oplossing in de schaduw is weinig of niet achteruitgelopen, doch die van de fel belichte oplossing in sterke mate. De lichtintensiteit in de zon was 30 × zo hoog als die in de schaduw.

Invloed van de pH op de inactivering tijdens bewaring in het licht werd niet gevonden.

Dr. H. O. HUISMAN van N.V. Philips-Roxane te Weesp wees in verband met het bovenstaande op literatuurgegevens, welke aantonen, dat bij geconjugeerde polyenen cis-trans isomerie kan optreden tijdens blootstelling van een oplossing aan licht van een bepaalde golflengte of aan zonlicht (ZECHMEISTER, 1954). Tussen deze isomeren kunnen belangrijke verschillen in eigenschappen bestaan. Zo vond JACOBSON (1954), dat bij affinine de stereoisomere configuratie bepalend was voor de insecticide eigenschappen van deze stof; bij verandering in de „all-trans" vorm ging de insecticide werking verloren. Daar het absorptiespectrum in het ultraviolet aanwijzingen kan verschaffen betreffende deze isomerie, is dit zowel voor een verse oplossing van rimocidine bepaald, als voor een oplossing, die gedurende 10 dagen aan daglicht was blootgesteld geweest. Het antibioticum was in een concentratie van 1000 p.p.m. opgelost in methanol 80% en voor de bepaling verdund (fig. 21).

De extinctiewaarden van de drie hoofdmaxima bij respectievelijk 291, 304 en 318 mμ zijn duidelijk verlaagd; de ligging is echter onveranderd. Daarnaast is een nieuw maximum gevormd bij lagere golflengte, nl. bij 230 mμ. Volgens Dr. HUISMAN zou dit de z.g. „cis-peak" zijn, veroorzaakt door trans-cis isomeri-

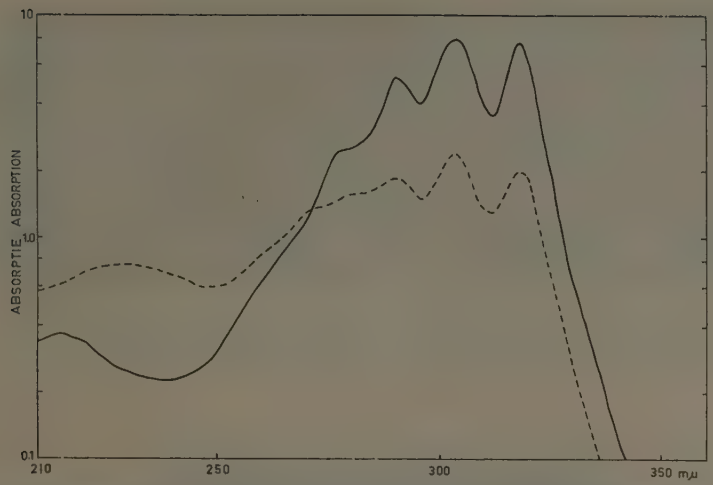


FIG. 21. Absorptiespectrum in het ultraviolet van een oplossing van rimocidine-sulfaat in 80% methanol. —— vers gemaakte oplossing, ---- 10 dagen bewaard in daglicht (Bepaling uitgevoerd door Organisch Chemisch Instituut T.N.O. te Utrecht).

Absorption spectrum in the ultraviolet of a solution of rimocidin sulphate in 80% methanol. —— not stored, ---- stored in daylight for 10 days. (Assessed by „Organisch Chemisch Instituut T.N.O." at Utrecht).

satie onder invloed van daglicht. Bij dit antibioticum blijkt dus de trans-configuratie een sterke fungicide werking te hebben, terwijl de cis-configuratie aanmerkelijk minder actief, wellicht zelfs inactief is.

Ook het antibioticum pimaricine verliest bij blootstelling aan daglicht zijn fungicide activiteit. De verandering van het ultraviolet absorptiespectrum na belichting was analoog aan die van belichte rimocidine, zodat we ook bij dit antibioticum een verlies van fungicide activiteit kunnen constateren bij overgang van de trans- in de cis-configuratie.

5. BESPREKING

Rimocidine en pimaricine behoren blijkens het absorptiespectrum in het ultraviolet tot een groep van antibiotica, die een polyeenstructuur bezitten. Bij alle tot nu toe gevonden antibiotica van dit type treden de fungicide eigenschappen sterk op de voorgrond. De werking tegen schimmels is in hoge mate universeel. Onder de door mij onderzochte schimmels was er geen, die niet gevoelig was voor rimocidine.

Beide antibiotica verliezen in daglicht hun fungicide werking doordat isomerisatie optreedt van de actieve trans-vorm naar de weinig of niet actieve cis-configuratie. Het is nog niet te beoordelen in hoeverre deze waarneming van belang kan zijn bij het onderzoek naar de wijze, waarop de fungicide werking plaats heeft.

Naast de bovengenoemde overeenkomsten tussen beide antibiotica, staan ook duidelijke verschillen. Deze kwamen naar voren bij het papierchromatografisch onderzoek en verder bij vergelijking van de fungicide werking. In de proeven met schijfjes filtreerpapier gaf pimaricine steeds groter remmingszones dan rimocidine. Evenwel had rimocidine een gelijk of zelfs iets beter effect dan pimaricine na menging van de antibiotica door de agar. Deze resultaten moeten vermoedelijk verklaard worden door een betere diffusie van pimaricine door de agar tengevolge van een minder sterke binding.

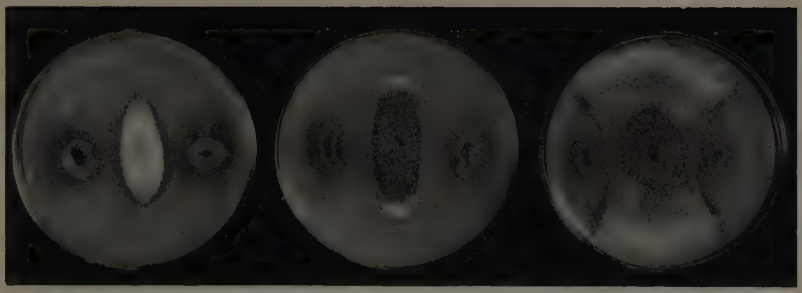


FIG. 22. Antagonisme van Streptomyces rimosus ten opzichte van enige schimmels; v.l.n.r.: Ascochyta pisi, Mycosphaerella pinodes en Ascochyta pinodella.
Antagonism of Streptomyces rimosus in regard to some fungi; from left to right: Ascochyta pisi, Mycosphaerella pinodes and Ascochyta pinodella.

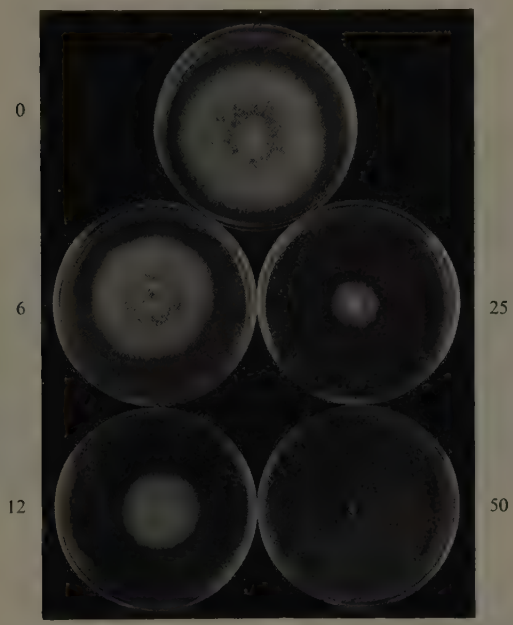


FIG. 23. Groei van Ascochyta pisi op aardappelglucose-agar, waardoorheen zuiver rimocidine-sulfaat gemengd is tot een concentratie van 6, 12, 25 en 50 p.p.m.
Growth of Ascochyta pisi on potato glucose agar mixed with pure rimocidin sulphate at concentrations of 6, 12, 25 and 50 p.p.m.

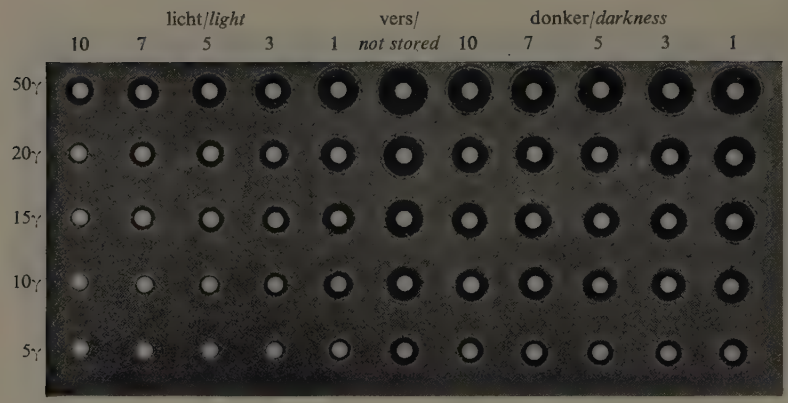


FIG. 24. Invloed van het licht op de fungicide werking van rimocidine. Remmingszones in Aspergillus niger, veroorzaakt door opklimmende hoeveelheden zuiver rimocidine-sulfaat, dat als oplossing in methanol gedurende 1, 3, 5, 7 en 10 dagen bewaard was in het donker of bij daglicht.
Influence of light on the fungicidal activity of rimocidin. Inhibition zones in Aspergillus niger, caused by increasing quantities of pure rimocidin sulphate, which had been stored as a solution in methanol in darkness or by daylight during 1, 3, 5, 7 and 10 days.

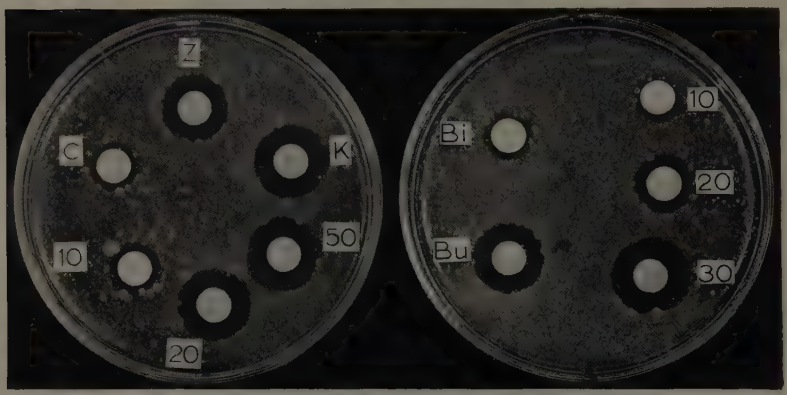


FIG. 25. Verdeling van het antibioticum in het zaad. Zaden gedurende 24 uur geweekt in 100 p.p.m. pimaricine.
a. Extracten van gelijke gewichten aan cotylen, kiempjes en zaadhuiden, vergeleken met die van een standaardreeks.
b. Extracten van de binnen- en buitenhelft van cotylen, vergeleken met die van een standaardreeks.
Remmingszones in Aspergillus niger.
Distribution of antibiotics in the seed. Seeds soaked in 100 p.p.m. pimaricin for 24 hours.
a. Extracts of equal weights of cotyledons, embryos and seed coats, compared with those of a standard range.
b. Extracts of the inner and outer half of cotyledons, compared with those of a standard range.
Inhibition zones in Aspergillus niger.

HOOFDSTUK III

INWENDIGE ONTSMETTING VAN DOOR ASCOCHYTA PISI AANGETASTE ZADEN MET RIMOCIDINE EN PIMARICINE

1. INLEIDING

De schimmel *Ascochyta pisi* bezit het vermogen in erwtezaden door te dringen en ook de cotylen en het kiempje aan te tasten. Tot nu toe is het uiterst moeilijk en riskant gebleken een dergelijke inwendige zaadaantasting door ontsmetting te elimineren. De enige methode die met succes in de practijk toegepast wordt, is de warmwaterbehandeling van granen, die door stuifbrand aangetast zijn (JENSEN, 1888). Tegen vele andere in het zaad aanwezige parasieten is deze methode niet bruikbaar, daar er geen of een te geringe marge is tussen de temperatuur, waarbij de schimmel gedood wordt, en die waarbij kiembeschadiging optreedt. Verder is het weken en terugdrogen van vele zaden omslachtig of niet goed mogelijk.

GADD (1950) werkte een warmwaterbehandeling uit ter ontsmetting van door *Ascochyta pisi* aangetaste erwtezaden. In onze proeven werden met deze methode onvoldoende resultaten verkregen (hoofdstuk III, 3A).

WALLEN & SKOLKO (1953) vermelden ook resultaat van weken der zaden in water bij kamertemperatuur. Na 18 uur weken en daarna terugdrogen gedurende een week, ontwikkelde zich op slechts 12% der zaden mycelium van *Ascochyta pisi*, tegenover 62,2% in het controle object. Wanneer echter de zaden, na terugdrogen, gedurende 15 minuten in chloorwater gedompeld werden, trad dit gunstige effect niet op. Op de geweekte zaden had in veel sterker mate bacteriegroei plaats dan op de niet geweekte. De auteurs veronderstelden dat door deze bacteriën een of meer fungicide antibiotica gevormd waren, die door chloorwater werden geïnactiveerd.

Ook tegen stuifbrand bij gerst werd door weken in water bij kamertemperatuur een ontsmettend effect verkregen (TYNER, 1951, 1953, 1954, RUSSELL, 1953, RUSSELL & TYNER, 1954, LEBEN & ARNY, 1954, ARNY & LEBEN, 1954, HEBERT, 1955, 1956). HEBERT toonde door steriel te werken aan, dat hier geen antibiotische stoffen in het spel konden zijn, doch dat anaerobe condities de inwendige ontsmetting bewerkstelligden. LEBEN, SCOTT & ARNY (1956) toonden in het water, waarin gerstezaden geweekt waren, een aantal zuren aan, die gevormd waren tengevolge van de stofwisseling der zaden onder anaerobe omstandigheden. De kieming der sporen van *Ustilago nuda* (JENS.) ROSTR. werd door deze zuren verhinderd.

Er zijn dus verschillende verklaringen mogelijk voor de waarneming dat door weken der zaden in water bij kamertemperatuur inwendige zaadontsmetting plaats heeft. De resultaten, verkregen met deze behandelingswijze, zijn echter wisselend, terwijl langdurig weken ook schadelijk kan zijn voor de kieming (ARNY & LEBEN, 1955).

Met chemische middelen is tot nu toe weinig bereikt. In vele gevallen werd bovendien het zaad beschadigd (HANNA & POPP, 1935, TYNER, 1951, ZEMANEK & BARTOS, 1956). BAUMANN (1953, 1954) deelt mede, dat enkele niet nader genoemde „Hormonmittel" werking hadden tegen *Ascochyta pisi* in erwtezaden, en BREMER (1955), dat niet nader genoemde stoffen, aangeduid als „Mittel A und B", effect hadden tegen *Pseudomonas phaseolicola* (BURKH.) DOWSON in bonezaden.

Na de laatste wereldoorlog trokken ook antibiotica de aandacht als mogelijke interne zaadontsmetters. Reeds een groot aantal antibiotische stoffen met fungicide of bactericide werking zijn geïsoleerd uit cultures van schimmels en bacteriën, en ook uit hogere planten. Sommige van deze bleken, ondanks de vaak zeer gecompliceerde structuur, gemakkelijk planteweefsel te kunnen binnendringen, en boden dus in principe perspectieven voor de bestrijding van inwendig in het zaad voorkomende pathogenen, welke tot nog toe niet te bestrijden waren. Eveneens zouden ze van voordeel kunnen zijn bij de vervanging van de warmwaterbehandeling van granen door een behandeling met een niet verhitte vloeistof.

De meeste aandacht is tot nu toe besteed aan antibiotica, die op bacteriën werken. Dit ligt ook voor de hand, daar het grote belang van toepassing van deze middelen in eerste instantie op medisch terrein ligt, waar bacterieziekten een veel voornamer rol spelen dan schimmelziekten. Aanvankelijk werd bij het zoeken naar antibiotica niet eens gelet op een eventueel aanwezige werking tegen schimmels. De laatste jaren wordt, mede in verband met de mogelijkheden tot aanwending in de fytopathologie, ook aan fungicide antibiotica grote aandacht besteed. Behalve met min of meer zuivere preparaten zijn ook proeven genomen met ruwe cultuurvloeistoffen van antibioticum producerende microorganismen. In het hieronder volgende overzicht zijn niet opgenomen de proeven tegen parasieten, waarvan bekend is, dat ze alleen oppervlakkig op het zaad voorkomen.

Vele proeven zijn genomen met het bactericide antibioticum streptomycine. ARK (1947, 1954) ontsmette komkommerzaden, die kunstmatig geïnoculeerd waren met *Pseudomonas lachrymans* (SMITH & BRYAN) CARSNER, door onderdompeling gedurende 20 minuten in een oplossing van streptomycine. Hoewel deze bacterie inwendig in het zaad voorkomt (WILES & WALKER, 1951), is het niet geheel duidelijk of in de genoemde proeven de bacterie door de kunstmatige inoculatie wel tot in het inwendige van de zaden was doorgedrongen, en er dus sprake is van een inwendige werking van streptomycine. Door ARK werden eveneens goede resultaten verkregen met weken van tomatezaden in streptomycine ter bestrijding van de door *Corynebacterium michiganense* (ERW. SMITH) JENSEN veroorzaakte bacteriekanker (1949), en van katoenzaden tegen *Xanthomonas malvacearum* (ERW. SMITH) DOWSON (1954). Merkwaardig is dat het mogelijk bleek met streptomycine ook een schimmel te bestrijden, nl. *Ustilago nuda* (JENS.) ROSTR. in gerstezaden (PAULUS & STARR, 1951). THOMAS (1956) verkreeg gezonde zaailingen uit natuurlijk met *Pseudomonas sesami* MALKOFF. besmet sesamzaad, wanneer hij dit gedurende 30 minuten in streptomycineoplossingen van 250–1000 p.p.m. dompelde. KEYWORTH (1956) ontsmette bietezaad, aangetast door *Corynebacterium betae* KEYWORTH, HOWELL & DOWSON door weken in streptomycine. Uit 8000 onbehandelde zaden groeiden 90 zieke zaailingen, en uit eenzelfde aantal behandelde zaden slechts 2.

Door verschillende onderzoekers zijn proeven genomen met antibiotica, voornamelijk streptomycine, ter ontsmetting van bonezaden, die door de vetvlekkenziekte, *Pseudomonas phaseolicola* (BURKH.) DOWSON, zijn aangetast. SMITH (1949) vermeldt, dat hij goede resultaten verkreeg door de bonen gedurende 1 uur te weken in een streptomycineoplossing van 0,1 %. Ook HILDRETH & STARR (1950) en STARR, BURKE e.a. (1951) verkregen positieve resultaten. Het effect in veldproeven viel echter tegen. MARLATT (1955) vond geen effect van weken in een 0,2% oplossing; de duur van de behandeling was echter slechts 15 minuten. GRÜMMER & MACH (1955) vermelden een aanzienlijke onderdrukking van het ziektepercentage, wanneer de bonen in een oplossing van 0,1 % streptomycine gelegd werden tot een gewichtsvermeerdering van 25% bereikt was. Dit gold ook voor een 1% oplossing van patuline, een antibioticum, dat behalve bactericide werking ook fungicide activiteit heeft. Een meer uitvoerig onderzoek betreffende de ontsmetting van vetvlekkenzieke bonen werd verricht door KLINKOWSKI en zijn medewerkers (KLINKOWSKI 1952, 1953, KLINKOWSKI & KÖHLER, 1952, SCHRÖDTER, 1954, KLINKOWSKI, KÖHLER & SCHRÖDTER, 1955). Het gelukte hen, door besmet zaad gedurende 2 uur te weken in cultuurfiltraten van *Penicillium chrysogenum* THOM en *Streptomyces griseus* (KRAINSKY) BERGEY, het optreden van de vetvlekkenziekte in bonen in sterke mate te onderdrukken, zowel onder kas- als onder veldomstandigheden. Ook ruwe streptomycine was effectief, maar zuivere penicilline gaf minder goede resultaten. Streptomycine bleek zowel gezonde als zieke bonen te kunnen binnendringen; het antibioticum verdeelde zich gelijkmatig in het gehele zaad. Verder toonden zij aan, dat het effect van de genoemde cultuurfiltraten samenhangt met de wisselingen van de bodemtemperatuur gedurende de eerste 2 dagen na uitzaaien.

Verder kunnen nog genoemd worden de ontsmettingsproeven met subtiline tegen *Xanthomonas translucens* HAGBORG op tomatezaden (GOODMAN & HENRI, 1947), met penicilline tegen *Corynebacterium michiganense* (ERW. SMITH) JENSEN op tomatezaden (GRANITS & JANKE, 1954) en met aureomycine tegen *Xanthomonas campestris* (PAMPEL) DOWSON op knolraapzaden (SUTTON & BELL, 1954). MIRZOBEKYAN (1952) en KRASILNIKOV (1953) vonden werking van de cultuurfiltraten van enkele actinomyceten tegen *Xanthomonas malvacearum* (ERW. SMITH) DOWSON op katoenzaad. DARPOUX (1948, 1949, 1950) kon *Pseudomonas tabaci* (WOLF & FOSTER) STEVENS op tabakszaden in sterke mate onderdrukken door weken gedurende enige uren in de cultuurvloeistof van een niet geïdentificeerde actinomyceet.

Zeer weinig onderzoek is nog verricht met antibiotica tegen inwendig in zaden aanwezige schimmels. TIMONIN (1946) boekte geen resultaat met patuline tegen *Ustilago tritici* (PERS.) ROSTR. in tarwe. CHINN & RUSSELL (1956) vonden geen duidelijk effect van de cultuurvloeistof van *Pseudomonas viscosa* (FRANKLAND & FRANKLAND) MIGULA tegen *Ustilago nuda* (JENS.) ROSTR. in gerst. Meer succes hadden onderzoekers in Canada met actidion en „antibiotic XG" tegen *Ascochyta pisi* in erwtezaden (WALLEN & SKOLKO, 1950, 1951, WALLEN, SUTTON & SKOLKO, 1950). Beide antibiotica gaven goede resultaten, wanneer de zaden gedurende 18 uur geweekt werden in een oplossing van 25 p.p.m. „Antibiotic XG" gaf slechts een geringe remming van de kieming, actidion was evenwel sterk fytotoxisch. Van andere antibiotica wordt soms een stimulerende werking gemeld (KLINKOWSKI, 1955).

Op het Laboratorium voor Phytopathologie te Wageningen werd in 1954

begonnen met onderzoek over de inwendige ontsmetting van zaden met antibiotica. Toen gebleken was, dat rimocidine een goede werking had tegen *Ascochyta pisi* (DEKKER, 1955a, 1955b, OORT & DEKKER 1955), werden enige oriënterende proeven genomen met andere schimmels, die inwendig in het zaad aanwezig zijn. Gunstige resultaten werden verkregen tegen *Colletotrichum lindemuthianum* (SACC. & MAGN.) BRI. & CAV. in bonezaden en *Stemphyilum radicinum* (MEIER, DRECHSL. & EDDY NEERG.) in wortelzaad. Later werd ook het antibioticum pimaricine bij het onderzoek betrokken. Het bleek behalve tegen *Ascochyta pisi* ook werkzaam te zijn tegen *Botrytis cinerea* PERS. EX FR. in vlaszaad en *Phoma betae* (OUDEM.) FRANK in bietezaad. Tegen stuifbrand bij gerst en tarwe werd door weken der zaden in rimocidine of pimaricine geen resultaat verkregen. De meeste aandacht is besteed aan de werking van de beide genoemde antibiotica tegen *Ascochyta pisi.*

In dit hoofdstuk zullen, na bespreking van het gebruikte materiaal en de gevolgde methodiek, de proeven besproken worden, die genomen zijn met de antibiotica rimocidine en pimaricine ter ontsmetting van door *Ascochyta pisi* aangetaste erwtezaden. Deze bestonden uit proeven met zaden in het laboratorium vanaf 1954, en verder uit kas- en veldproeven gedurende 1955 en 1956 uitgevoerd.

2. MATERIAAL EN METHODIEK

Gebruik is gemaakt van de volgende antibioticumpreparaten. Rimocidine, verschaft door de firma Pfizer & Co. te New York:

a) zuiver sulfaat
b) ruw, 76%

Pimaricine, verschaft door de Kon. Ned. Gist- en Spiritusfabriek N.V. te Delft:

a) zuiver
b) zuiver Na- zout
c) ruw, 92%

Onder een oplossing van deze antibiotica wordt in dit hoofdstuk steeds een waterige oplossing verstaan.

Tenzij anders vermeld, is steeds zaad gebruikt van het ras Eminent, oogstjaar 1954. Hiervan stond ter beschikking een partij met ruim 80% aantasting door *Ascochyta pisi*, in de proeven steeds aangeduid als „zwaar aangetast zaad" of „aangetaste zaden", en verder een monster met ruim 40% aantasting. Een partij nagenoeg gezond zaad was van het oogstjaar 1955.

Op twee wijzen werd het effect van de behandeling der zaden bepaald.

1. Door uitleggen van de zaden op filtreerpapier, en tellen van het aantal waarop mycelium van *Ascochyta pisi* groeit (filtreerpapier-toets).

2. Door uitzaaien der zaden en tellen van het aantal zieke planten (kas- en veldproeven).

Tenzij anders vermeld, wordt onder zieke planten steeds verstaan, planten die ziek worden als gevolg van een inwendige besmetting vanuit het zaad.

De behandeling van door *Ascochyta pisi* aangetast zaad met de cultuurvloeistof van *Streptomyces rimosus* had aanvankelijk plaats door de zaden in deze vloeistof te weken. Toen echter het antibioticum in poedervorm ter beschikking kwam, konden – naast weken der zaden in een oplossing – ook andere toepassingsmethoden beproefd worden, nl. toediening als poeder, als een papje, hetgeen in de Amerikaanse literatuur „slurry" genoemd wordt, en als suspensie in methanol. De resultaten, welke met de genoemde methodes verkregen werden, zullen hieronder besproken worden.

A. Weken der zaden in een oplossing van rimocidine

Zwaar aangetast zaad werd gedurende 24 uur bij kamertemperatuur geweekt in oplossingen van 3, 6, 12, 25, 50, 100 en 200 p.p.m. rimocidine, en in water. In deze en de volgende proeven is ruwe rimocidine (76%) gebruikt. Per concentratie werden 80 zaden geweekt. Met behulp van de filtreerpapier-toets werd het percentage zaden bepaald, waaruit zich na de behandeling nog mycelium kon ontwikkelen (fig. 26):

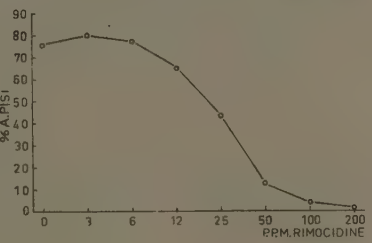


FIG. 26.
Effect van weken der zaden in oplossingen met verschillende concentraties rimocidine, ruw 76%. Ras Eminent, 24 uur geweekt. Filtreerpapier-toets.
Effect of soaking the seeds in different concentrations of rimocidin, crude 76%. Variety Eminent, soaked for 24 hours. Filter paper test.

Rimocidine blijkt dus een sterk effect te hebben tegen *Ascochyta pisi* in het zaad. Reeds bij 25 p.p.m. is het aantal zaden met mycelium duidelijk minder, en bij 100 en 200 p.p.m. zelfs zeer gering. Soms werd met 200 p.p.m. een volledige ontsmetting verkregen. De hierna volgende proeven zijn doorgaans echter met een concentratie van 100 p.p.m. uitgevoerd, daar bij 200 p.p.m. soms een lichte vertraging van de kieming geconstateerd werd.

De werking van het antibioticum kwam duidelijk tot uiting in het percentage zieke planten, verkregen uit aangetast zaad na 24 uur weken in een rimocidine oplossing van 100 p.p.m. (tab. 17).

TABEL 17. Aantal zieke planten uit zwaar aangetast zaad, ras Eminent, dat gedurende 24 uur geweekt is in rimocidine, ruw 76%, 100 p.p.m. of water. Gemiddelde uit 10 bakjes, elk met 50 zaden.

Table 17. Number of diseased plants from heavily infected seed, variety Eminent, which has been soaked for 24 hours in rimocidin, crude 76%, 100 p.p.m. or water. Average of 10 flats, each containing 50 seeds.

		rimocidine	water
aantal opgekomen planten	*number of plants emerged*	34,6 ± 4,8	36,5 ± 0,8
aantal zieke planten	*number of diseased plants*	0,7 ± 0,2	19,6 ± 1,5

De iets mindere opkomst van het met rimocidine behandelde object ligt binnen de toevalsgrenzen. Het percentage zieke planten blijkt door weken in rimocidine van 40% tot 1,5% teruggebracht te zijn.

Hoewel rimocidine een uitstekende ontsmettende werking heeft ten opzichte van *Ascochyta pisi* in het zaad, blijkt toch uit de beide bovenvermelde proeven, dat in enkele zaden de schimmel niet gedood wordt. Uit proeven, beschreven in hoofdstuk IV, 5 blijkt dat na behandeling met rimocidine in de zaadhuid al het mycelium gedood was, maar dat uit sommige cotylen en kiempjes nog mycelium kon groeien. Hierbij is gedacht aan de mogelijkheid, dat bij enkele erwten het antibioticum niet in voldoende mate in het kiempje en de cotylen doorgedrongen zou zijn. Derhalve is op verschillende wijze getracht het doordringen van het antibioticum in het zaad te bevorderen.

Concentratie. Door opvoering van de rimocidine concentratie tot 300 p.p.m. werd geen absolute ontsmetting bereikt (tab. 18). Hierbij dient echter vermeld te worden, dat rimocidine slechts tot ± 200 p.p.m. in water oplosbaar is.

TABEL 18. Aantal zieke planten uit zwaar aangetast zaad, ras Eminent, na 24 uur weken in water en in diverse concentraties rimocidine, ruw 76%.

Table 18. Number of diseased plants from heavily infected seed, variety Eminent, after soaking in water or various concentrations of rimocidin, crude 76%.

geweekt in: *soaked in:*	aantal zaden *number of seeds*	opkomst *emergence*	ziek *diseased*
water	150	103	57
rimocidine 50 p.p.m.	150	107	11
rimocidine 100 p.p.m.	150	104	1
rimocidine 150 p.p.m.	150	110	1
rimocidine 200 p.p.m.	150	109	1
rimocidine 300 p.p.m.	150	104	1

Duur van het weken. De resultaten, verkregen met verlenging van de duur van het weken zijn weergegeven in tabel 19.

TABEL 19. Aantal zieke planten uit zwaar aangetast zaad, ras Eminent, na weken gedurende verschillende tijden in rimocidine, ruw 76%, 100 p.p.m. en water.

Table 19. Number of diseased plants from heavily infected seed, variety Eminent, after soaking in rimocidin, crude 76%, 100 p.p.m. or water for various periods of time.

geweekt in: *soaked in:*	uren *hours*	aantal zaden *number of seeds*	opkomst *emergence*	ziek *diseased*
rimocidine	16	100	74	6
rimocidine	24	100	77	2
rimocidine	32	100	73	1
rimocidine	40	100	69	1
rimocidine	48	100	53	0
water	24	100	73	28
water	48	100	65	19

Uit deze proef blijkt dat 16 uur weken te kort is en dat bij 48 uur weken geen zieke planten meer verschijnen, doch dat de opkomst dan duidelijk achteruit gaat. In een tweede proef met 300 zaden, waarin weken in rimocidine gedurende

48 uur vergeleken werd met weken in water gedurende 24 uur, werden deze resultaten bevestigd. Ook hier liep de opkomst door de 48-urige behandeling terug, en wel van 221 tot 164 planten. In de volgende proeven is de duur van het weken dan ook beperkt tot ongeveer 24 uur.

Oppervlakte-actieve stoffen. Getracht is verder om het binnendringen van rimocidine in het zaad te bevorderen door toevoeging van oppervlakte-actieve stoffen aan de oplossing van het antibioticum. Hiervoor zijn gekozen een stof met anionen-activiteit, een stof met kationen-activiteit en een neutrale stof, respectievelijk T-pol, Cetavlon en Tween 20. Geen van deze stoffen versterkte het effect van rimocidine, bepaald volgens de filtreerpapier-toets. Evenmin was dit het geval met glycerine in een concentratie van 2%, waarvan door GRAY (1956) gemeld wordt, dat het de penetratie van streptomycine bevorderde o.a. in bladeren van *Phaseolus vulgaris*.

Temperatuur. De temperatuur van de oplossing heeft wel invloed op de ontsmettende werking van het antibioticum. Dit bleek in een proef met 100 zaden per object, welke bij een temperatuur van respectievelijk 12, 20, 25, 30 en 35°C gedurende 24 uur geweekt werden in een oplossing van 100 p.p.m. rimocidine. Het percentage zaden, waarop zich na 6 dagen in de filtreerpapier-toets mycelium ontwikkeld had, is weergegeven in fig. 27.

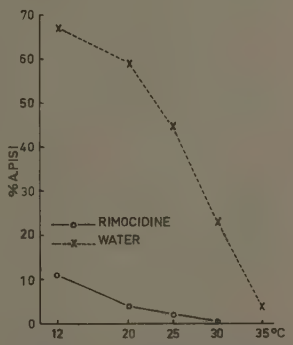


FIG. 27.
Invloed van de temperatuur van de oplossing op het effect van rimocidine, ruw 76%, 100 p.p.m. Ras Eminent, geweekt gedurende 24 uur. Filtreerpapier-toets.
Influence of the temperature of the solution on the effect of rimocidin, crude 76%, 100 p.p.m. Variety Eminent, soaked for 24 hours. Filter paper test.

Na weken in rimocidine bij 30°C en hoger ontwikkelde zich geen mycelium meer op de zaadhuid; bij 12°C was de ontsmetting minder goed dan bij 20 à 25°C. Ook na weken in water liep het percentage aangetaste zaden terug. Vanaf 30°C trad evenwel kiemremming op.

De indruk werd verkregen dat schudden der zaden tijdens het weken in het antibioticum het effect van de behandeling verhoogde. Derhalve werd een proef ingezet, waarin het effect van schudden, gecombineerd met een hogere temperatuur werd onderzocht. Aangetaste zaden werden geweekt in erlenmeyers van 300 cc, elk met 150 zaden en 200 cc van een 100 p.p.m. oplossing van rimocidine. Per object werden 600 zaden gebruikt. Het weken had plaats bij 23°C en bij 30°C, terwijl de erlenmeyers al dan niet continu geschud werden in een schudmachine. Beoordeling van het percentage zaden, waarop zich in de filtreerpapier-toets mycelium ontwikkeld had, vond plaats na 6 dagen (tabel 20).

TABEL 20. Invloed van de temperatuur en van schudden op zaadontsmetting met rimocidine, ruw 76 %, 100 p.p.m. Ras Eminent, 600 zaden 24 uur geweekt. Filtreerpapier-toets.

Table 20. Influence of temperature and of shaking on seed disinfection by rimocidin, crude 76 %, 100 p.p.m. Variety Eminent, 600 seeds soaked for 24 hours. Filter paper test.

behandeling *treatment*		zaden met mycelium *seeds with mycelium*	
		aantal/*number*	%
schudden, 30 °C	*shaking, 30 °C*	3	0,5
niet schudden, 30 °C	*no shaking, 30 °C*	13	2,2
schudden, 23 °C	*shaking, 23 °C*	6	1,0
niet schudden, 23 °C	*no shaking, 23 °C*	16	2,7

De invloed van weken bij hogere temperatuur, al dan niet gecombineerd met schudden, is ook onderzocht in kasproeven. Per object werden 300 zaden uitgezaaid in bakjes met gestoomde grond (tab. 21).

TABEL 21. Invloed van de temperatuur en van schudden op zaadontsmetting met rimocidine-sulfaat, 75 p.p.m. 300 zaden per object, ras Eminent, geweekt gedurende 24 uur.

Table 21. Influence of temperature and of shaking on seed disinfection by rimocidin sulphate, 75 p.p.m. 300 seeds per treatment, variety Eminent, soaked for 24 hours.

	behandeling *treatment*	opkomst *emergence*	aantal zieke planten *number of diseased plants*
rimocidine	schudden, . . . 30 °C *shaking, . . . 30 °C*	146	1
rimocidine	niet schudden, . 30 °C *no shaking, . 30 °C*	142	2
rimocidine	schudden, . . . 23 °C *shaking, . . . 23 °C*	219	2
rimocidine	niet schudden, . 23 °C *no shaking, . 23 °C*	222	4
water	niet schudden, . 23 °C *no shaking, . 23 °C*	221	48

De sterkste reductie van het aantal zieke planten wordt dus verkregen door weken bij 30 °C onder schudden. Bij deze temperatuur wordt de opkomst echter verminderd. Derhalve moet toch de voorkeur gegeven worden aan weken bij 23–25 °C.

Hierna is gedacht aan een combinatie van antibioticumbehandeling met warmwaterbehandeling, zoals deze in Zweden is bestudeerd. Daar vond men nl. dat *Ascochyta pisi* in erwtezaden bestreden kon worden, door deze op een bepaalde wijze met warm water te behandelen (GADD, 1950). CARLSSON (1956) trachtte de proeven van GADD geschikt te maken voor de practijk. Hij weekte de zaden gedurende 9 uur in water van 18–20 °C, en voerde daarna in 3 uur tijds de temperatuur van het water op tot 45 °C, waarna de zaden binnen 9 minuten uit het water gehaald werden. In veldproeven leverde het aldus behandelde zaaizaad een oogst met 2 % door *Ascochyta pisi* aangetast zaad, en het onbehandelde met 55 %.

Getracht is nu het percentage aan rimocidine ontsnappende zaden nog te

reduceren, door de antibioticumbehandeling te combineren met de beschreven warmwaterbehandeling. Hiertoe werd het water vervangen door een rimocidine-oplossing (ruw, 76%, 100 p.p.m.); i.p.v. 9 uur werden echter de zaden 24 uur geweekt bij 18–20°C, doch verder was de behandeling gelijk aan die van CARLSSON. Daarnaast werd de warmwaterbehandeling uitgevoerd zonder antibioticum, als boven beschreven. De resultaten zijn weergegeven in tabel 22.

TABEL 22. Effect van verwarming, na voorweken, op ontsmetting. Ras Eminent.
Table 22. Effect of heating, after pre-soaking, on disinfection. Variety Eminent.

voorweken ged. 24 uur bij 18–20°C in: *pre-soaking 18–20°C for 24 hours in:*	verwarming in 3 uur van 20 tot 45°C *heating from 20 to 45°C within 3 hours*	aantal zaden *number of seeds*		aantal/*number of*	
		uitgelegd *laid out*	ziek *diseased*	zaden uitgezaaid *seeds sown*	zieke planten *diseased plants*
water	–	200	147	500	159
water	water	200	157	500	113
rimocidine	–	200	6	200	8
rimocidine	rimocidine 100 p.p.m.	200	25	200	7

Hoewel de warmwaterbehandeling zonder toevoeging van rimocidine het mycelium in het zaad niet doodt (zie tabel 22 kolom 2), wordt het aantal zieke planten door deze behandeling wel enigszins gereduceerd (kolom 4). Klaarblijkelijk wordt de verhouding parasiet-zaad beïnvloed ten nadele van de schimmel, zonder dat deze laatste echter gedood wordt. Een verzwakking van de parasiet nl. zou er toe kunnen leiden, dat deze tijdens de kieming van het zaad niet tijdig het kiempje kan bereiken. De vermindering van het aantal zieke planten is echter te gering om er veel effect in het veld van te verwachten. Ook de combinatie van de Zweedse warmwatermethode met rimocidinebehandeling was niet beter dan de rimocidinebehandeling alleen.

pH van de oplossing. Vervolgens is onderzocht of de pH van de antibioticumoplossing invloed had op de ontsmetting van het zaad. Bij deze proef zijn rimocidineoplossingen (ruw 76%) van 25, 50, 100, 200 p.p.m. gebruikt, terwijl de duur van het weken steeds 24 uur bedroeg. Van deze oplossingen werden de pH's met behulp van een McIlvain buffer gebracht op 4, 6,3 en 8. Gebruik werd gemaakt van een zwaar aangetaste partij zaad, waaruit de in ultra-violet licht niet oplichtende zaden verwijderd waren. Per object werden 80 zaden gebruikt. De percentages zaden, waarop mycelium groeide in de filtreerpapier-toets is weergegeven in fig. 28.

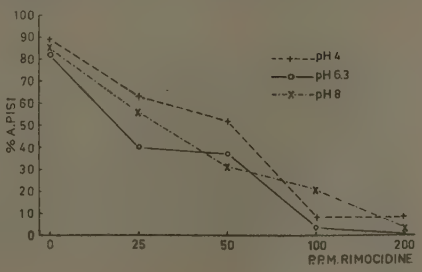


FIG. 28.
Invloed van de pH van de oplossing op het effect van rimocidine, ruw 76%, 100 p.p.m. Ras Eminent, geweekt gedurende 24 uur. Filtreerpapier-toets.
Influence of the pH of the solution on the effect of rimocidin, crude 76%, 100 p.p.m. Variety Eminent, soaked for 24 hours. Filter paper test.

De pH oefent dus weinig invloed uit op de werking van rimocidine; de neutrale oplossing schijnt iets beter te werken dan die met een zeer hoge of zeer lage pH.

Voorweken in water. Daar men zich kan afvragen of rimocidine juist door het opzwellen van de erwt mee naar binnen „gesleurd" wordt, is nagegaan of met weken in rimocidine ook effect verkregen werd bij reeds gezwollen erwten, die gedurende 8, respectievelijk 24 uur voorgeweekt waren in water. Het weken had plaats bij 23°C; er werden 300 zaden per object uitgezaaid in de kas. De opkomst en het aantal zieke planten is vermeld in tabel 23.

TABEL 23. Aantal zieke planten uit 300 zaden, welke met rimocidine-sulfaat 75 p.p.m. behandeld zijn na voorweken in water gedurende 8, respectievelijk 24 uur. Ras Eminent, zwaar aangetast.

Table 23. Number of diseased plants from 300 seeds, which were treated with rimocidin sulphate 75 p.p.m. after pre-soaking in water for 8 or 24 hours. Variety Eminent, heavily infected.

voorgeweekt in water gedurende: *pre-soaked in water for:*	daarna 24 uur geweekt in: *after that soaked for 24 hours in:*	aantal zaden *number of seeds*	opkomst *emergence*	ziek *diseased*
0 uur *(hours)*	water	300	221	48
0 uur *(hours)*	rimocidine	300	225	4
8 uur *(hours)*	rimocidine	300	214	2
24 uur *(hours)*	rimocidine	300	197	0

Uit deze proef blijkt dat de sterke wateropname tijdens de zwelling geen belangrijke rol speelt bij het binnendringen van rimocidine. Immers, ook wanneer de zaden vóór de toediening van het antibioticum reeds gezwollen zijn, werd een goed effect verkregen. Er verscheen in dit geval zelfs geen enkele zieke plant meer. Wanneer de zaden gedurende slechts 8 uur werden voorgeweekt in water, werden nog wel enkele zieke planten aangetroffen, hoewel de zaden na het voorweken reeds hun maximale hoeveelheid water hadden opgenomen. Dit verschijnsel zal nader besproken worden in hoofdstuk IV, 5. De opkomst is bij 24 uur voorweken duidelijk minder.

Uit het bovenstaande kunnen we concluderen dat een 100% ontsmetting op 3 manieren verkregen kan worden, en wel door:

a) langer dan 24 uur weken, nl. 48 uur
b) weken bij een temperatuur van 30–35°C
c) 24 uur voorweken in water vóór de behandeling met rimocidine.

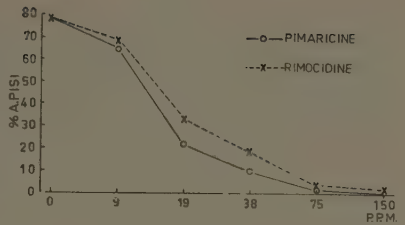
In al deze 3 gevallen wordt echter de kieming van het zaad verminderd.

B. Weken der zaden in een oplossing van pimaricine

Daar het antibioticum pimaricine pas in 1956 te onzer beschikking kwam, en zich bovendien ten opzichte van *Ascochyta pisi* analoog aan rimocidine gedroeg, is slechts een gedeelte der met rimocidine gedane proeven herhaald met pimaricine. In de filtreerpapier-toets, waarbij per object 100 aangetaste Eminent zaden gedurende 24 uur geweekt werden in oplossingen van pimaricine (ruw 92%) met oplopende concentraties, werden de in grafiek 29 weergegeven resultaten verkregen. Ter vergelijking is ook het resultaat met rimocidine sulfaat weergegeven.

FIG. 29.
Vergelijking van de werking van pimaricine en rimocidine. Zaden gedurende 24 uur geweekt in oplossingen met verschillende concentraties rimocidine-sulfaat en pimaricine, ruw 92%. Ras Eminent. Filtreerpapiertoets.

Comparison of the effect of pimaricin and rimocidin. Seeds soaked in various concentrations of rimocidin sulphate and pimaricin, crude 92%, for 24 hours. Variety Eminent. Filter paper test.



Hoewel op agar de myceliumontwikkeling van *Ascochyta pisi* door rimocidine sterker geremd wordt dan door pimaricine (tab. 15), blijkt in vivo pimaricine iets sterker werkzaam te zijn. Dit komt ook enigszins tot uiting bij uitzaaien van ziek zaad (tab. 24).

TABEL 24. Vergelijking van de werking van pimaricine en rimocidine. Aantal zieke planten uit 300 zaden, na weken gedurende 24 uur in rimocidine-sulfaat of pimaricine, ruw 92%. Concentraties 75 p.p.m. Ras Eminent, zwaar aangetast.

Table 24. Comparison of the effect of pimaricin and rimocidin. Number of diseased plants from 300 seeds, after soaking in rimocidin sulphate or pimaricin, crude 92%. Concentrations 75 p.p.m. Variety Eminent, heavily infected.

geweekt in: *soaked in:*	opkomst *emergence*	ziek *diseased*
rimocidine . . .	225	2
pimaricine . . .	219	1
water	221	48

Hoewel deze proef te klein is om een definitieve conclusie te trekken, kan toch wel aangenomen worden, dat pimaricine een iets sterkere ontsmettende werking heeft dan rimocidine, daar deze tendens ook in andere proeven aanwezig was. Toch geeft ook pimaricine geen 100% ontsmetting.

C. Toediening der antibiotica op andere wijze

Daar machinaal uitzaaien van gezwollen zaden niet goed mogelijk is, en terugdrogen van geweekte zaden lastig is en gevaar kan opleveren voor een normale kieming, is onderzocht of rimocidine en pimaricine ook op andere wijze dan door weken kunnen worden toegepast. Hierbij zijn de onderstaande methodes beproefd.

Pap-behandeling (slurry). De zaden werden behandeld met een breiachtig papje van het antibioticum, verkregen door een zeer geringe hoeveelheid water aan het poedervormige antibioticum toe te voegen. Hierbij werd carboxymethylcellulose (CMC) als hechtmiddel gevoegd. Het papje droogde snel op en bleef als een dun korstje om het zaad zitten. Wanneer de zo behandelde zaden in de filtreerpapier-toets beoordeeld werden, bleek het effect van deze slurrymethode onvoldoende te zijn. Bij deze toets echter heeft de wateropname eenzijdig plaats vanuit het filtreerpapier, waarop de erwten liggen en krijgt het antibioticum niet voldoende kans de erwt van alle kanten binnen te dringen. Veel beter was het effect, wanneer de erwten na de slurry-behandeling in vochtige

vermiculiet gestopt werden, zodat de opname van water alzijdig plaats kon hebben. Na enkele dagen werden de zaden uit de vermiculiet gehaald en afgespoeld. Vervolgens werden ze, ter beoordeling op *Ascochyta*, uitgelegd op filtreerpapier. Bij behandeling van 20 erwten met een papje, bestaande uit 32 mg rimocidine (ruw 76%), 8 mg CMC en 0,08 cc water werden geen zaden met mycelium aangetroffen, tegenover 15 zaden in het controle-object.

Uit deze oriënterende proef bleek dus, dat rimocidine, toegediend als slurry, werkzaam was tegen *Ascochyta* in het zaad. Vervolgens zijn proeven genomen, waarin een groter aantal zaden met een slurry behandeld en daarna uitgezaaid werd. Aan het percentage zieke planten, dat uit deze zaden groeide, werd het effect van de behandeling afgemeten. Dit wisselde sterk, zoals blijkt uit tabel 25. In het algemeen was het resultaat aanmerkelijk minder dan na weken der zaden in een oplossing. Dit gold ook voor pimaricine.

TABEL 25. Effect van een pap-behandeling in een drietal proeven met rimocidine, ruw 76%, en pimaricine, ruw 92%. Ras Eminent. Per 100 zaden werd 160 mg antibioticum, 40 mg carboxy-methylcellulose en 0,4 ml water gebruikt.

Table 25. Effect of a slurry-treatment in three experiments with rimocidin, crude 76%, and pimaricin, crude 92%. Variety Eminent. Per 100 seeds 160 mgm of antibiotics, 40 mgm of carboxy-methylcellulose and 0,4 ml of water was used.

behandeling *treatment*	aantal zaden *number of seeds*	opkomst *emergence*	zieke planten/*diseased plants*	
			aantal/*number*	%
A. rimocidine-slurry . .	200	126	3	1,5
onbehandeld/*control*	200	122	81	40,5
B. rimocidine-slurry . .	300	212	18	6,0
onbehandeld/*control*	300	223	90	30,0
pimaricine-slurry . .	300	224	30	10,0
C. rimocidine-slurry . .	300	195	32	10,7
onbehandeld/*control*	300	181	77	25,7
pimaricine-slurry . .	300	190	32	10,7

Het is nog niet geheel duidelijk welke factoren in zo sterke mate het effect van deze slurrybehandeling beïnvloeden. Vermoedelijk zullen de snelheid, waarmee het zaad kiemt en de mate van afspoeling van het antibioticum door regen of gietwater wel een rol spelen. Niettemin kan uit het feit, dat deze methode effect, en soms zelfs een goed effect heeft tegen *Ascochyta pisi*, de conclusie getrokken worden dat het antibioticum tijdens de zwelling van de erwten in de grond met het water mee het zaad binnendringt.

Poederbehandeling. Deze behandeling is uitgevoerd analoog aan de normale droogontsmettingsmethode. Per 100 zaden werd 100 mg van het antibioticum gebruikt, nl. rimocidine, ruw 76%, respectievelijk pimaricine, ruw 92%. Dit komt overeen met ongeveer 4½ gram antibioticum per kg zaaizaad. Het zaad werd hiermee geschud in een afgesloten flesje gedurende 4 minuten en daarna uitgezaaid. Ook hier waren de resultaten wisselend, en in het algemeen niet zeer gunstig (tabel 26).

Door de poeder-behandeling wordt dus het aantal zieke planten t.o.v. het controle-object verminderd met 40–80%. Dit resultaat is ongunstig vergeleken met het weken in een oplossing, waarbij meer dan 95% effect bereikt wordt, en in speciale gevallen zelfs 100%. Het heeft geen zin een hoger dosering te gebruiken, daar meer antibioticum niet aan het zaad hecht.

TABEL 26. Effect van een poeder-behandeling in een drietal proeven met rimocidine, ruw 76%, en pimaricine, ruw 92%. Per 100 zaden werd 100 mg antibioticum gebruikt. Ras Eminent.

Table 26. Effect of a powder-treatment in three experiments with rimocidin, crude 76%, and pimaricin, crude 92%. Per 100 seeds 100 mgm of antibiotics was used. Variety Eminent.

behandeling *treatment*	aantal zaden *number of seeds*	opkomst *emergence*	zieke planten/*diseased plants*	
			aantal/*number*	%
A. rimocidine-poeder . *rimocidin-powder*	100	50	5	5
onbehandeld . . . *control*	100	57	23	23
B. pimaricine-poeder . *pimaricin-powder*	300	227	27	9
onbehandeld . . . *control*	300	223	90	30
C. rimocidine-poeder . *rimocidin-powder*	300	200	36	12
pimaricine-poeder . *pimaricin-powder*	300	200	46	15,3
onbehandeld . . . *control*	300	181	77	25,7

Behandeling met een suspensie in methanol. Bij deze methode is nagegaan of om de zaden een dun filmpje vloeistof aangebracht kan worden waarin zich voldoende antibioticum bevindt om het zaad te ontsmetten. Als

TABEL 27. Effect van behandeling met een suspensie in methanol van rimocidine, ruw 76%, en pimaricine, ruw 92%. Ras Eminent.

Table 27. Effect of treatment with a suspension in methanol of rimocidin, crude 76%, or pimaricin, crude 92%. Variety Eminent.

	behandeling *treatment*	dosis/100 zaden *dose/100 seeds*	aantal zaden *number of seeds*	opkomst *emergence*	zieke planten *diseased plants*	
					aantal *number*	%
A.	rimocidine 7%	0,14ml	100	69	10	10
	rimocidine 7%	3 × 0,14ml	100	72	3	3
	rimocidine 10%	0,20ml	100	74	6	6
	rimocidine 10%	0,14ml	100	73	11	11
	rimocidine 10%	3 × 0,14ml	100	69	3	3
	methanol alléén/*only*	3 × 0,14ml	100	72	31	31
B.	rimocidine 14% + Opp.[1]	0,14ml	100	70	12	12
	rimocidine 14% + Opp.[1]	3 × 0,14ml	100	72	11	11
C.	pimaricine 14%	3 × 0,14ml	300	227	4	1,3
	onbehandeld/*control*	–	300	223	90	30
D.	pimaricine 14%	3 × 0,14ml	300	178	36	12
	rimocidine 14%	3 × 0,14ml	300	189	37	12,3
	rimocidine 14% + Opp.[1]	3 × 0,14ml	150	89	19	12,7
	rimocidine 14% + H_1[2]	3 × 0,14ml	150	91	19	12,7
	rimocidine 14% + H_2[2]	3 × 0,14ml	150	90	26	17,3
	onbehandeld/*control*	–	300	181	77	25,7

[1] Opp. = opppervlakte actieve stof/*detergent*
[2] H_1, H_2 = hechter/*sticker*

vloeistof is methanol gekozen. Van beide antibiotica is een suspensie gebruikt, waarvan de concentratie 7, 10 of 14% bedroeg. De hoeveelheid vloeistof is zodanig gekozen, dat met een zo klein mogelijke hoeveelheid alle zaden nog juist met een filmpje bedekt werden. Hiervoor werd 1/7 cc per 100 zaden, ofwel 6 cc per kg zaad gebruikt. Het zaad werd gedurende 4 minuten geschud. De methanol verdampte snel, waarna het antibioticum zich in een dun huidje om het zaad bevond. In vele gevallen is de behandeling drie maal herhaald om de hoeveelheid antibioticum op het zaad te vergroten. Van rimocidine zijn verder oplossingen beproefd, waaraan een oppervlakte-actieve stof (Opp.)[1] of een hechter (H_1, H_2)[1] toegevoegd was. De resultaten van een viertal proeven zijn weergegeven in tabel 27.

Uit proef A blijkt dat 3× behandelen van het zaad beter is dan éénmaal. In proef D werd geen effect gevonden van toevoeging van een oppervlakte-actieve stof of een hechter. Verder blijkt het effect van deze behandeling de ene keer veel beter te zijn dan de andere, doch in het algemeen onvoldoende.

4. VELDPROEVEN

Het doel der veldproeven was om na te gaan, of de sterke vermindering van het aantal zieke planten uit aangetaste zaden door behandeling met rimocidine of pimaricine ook in het veld geconstateerd kon worden. Bovendien was het in het veld mogelijk het verloop van de aantasting gedurende het gehele seizoen na te gaan, en tenslotte de aantasting van het geoogste zaad te bepalen.

A. Veldproeven in 1955

Als zaaizaad werden erwten van het ras Eminent gebruikt, met een *Ascochyta*-percentage van 60%. Het zaad werd met rimocidine (ruw 76%) in de vorm van een slurry behandeld. Per kg zaaizaad werd 6½ gram antibioticum, 2 gram carboxy-methylcellulose en 20 cc water gebruikt. Uitzaai van 0,9 kg zaad had plaats op een oppervlak van ruim 0,8 are (115 kg/ha), op zware kleigrond bij het laboratorium. Op ruim 100 m afstand werd op hetzelfde terrein een even groot oppervlak bezaaid met onbehandeld zaad. Het zaaien had plaats op 6 april. Er is ruim gezaaid om de beoordeling te vergemakkelijken. De rijenafstand bedroeg 35 cm en de afstand in de rij 6 cm. Van het geoogste zaad is het percentage zaden bepaald, waarop in de filtreerpapier-toets mycelium groeide, en het percentage zieke planten dat na uitzaaien verscheen (tab. 28).

Behandeling van zaaizaad met rimocidine in de vorm van een slurry reduceert in sterke mate het aantal zieke planten. Desondanks is dit in het behandelde object nog vrij hoog, nl. 1,4%, ofwel 56 zieke planten in een veldje van 0,8 are. Dit is dus bijna 1 zieke plant per m^2. In hoofdstuk I, 5 is aangetoond, dat onder voor de schimmel gunstige omstandigheden, één zieke plant in een veldje van 1 m^2 een hoog percentage zaadaantasting kan teweegbrengen. Het effect van de slurry-behandeling is dus nog niet afdoende geweest, waarbij echter ook in aanmerking genomen moet worden, dat het zaaizaad zo zwaar aangetast was, dat het in de practijk zeker niet uitgezaaid zou zijn. Derhalve is in 1956 ook zaad met een veel lager percentage aantasting gebruikt en heeft de toediening van het antibioticum door weken plaats gehad.

[1]) Formulering door G. Ligtermoet & Zoon, N.V. te Rotterdam.

TABEL 28. Enkele gegevens uit een veldproef in 1955, waarin het zaaizaad met rimocidine in de vorm van een slurry behandeld was (6,5 gram/kg).

Table 28. Some data from a field trial in 1955, in which the seed for sowing had been treated with rimocidin as a slurry (6,5 gms/kg).

	rimocidine *rimocidin*	onbehandeld *not treated*
percent. opgekomen planten *percent. of plants emerged*	65,2	59,4
zieke planten, in % van zaden, eind mei *diseased plants, % of seeds, end of May*	1,4	17,1
zieke planten, in % van zaden, eind juni *diseased plants, % of seeds, end of June*	3,8	27,9
percent. peulen met vlekken (na oogst) *percent. of pods with spots (after harvest)*	12	19
opbrengst in kg *yield in kg*	11,3	11,6
beoordeling geoogst zaad: *assessment of seed harvested:*		
a) % A. pisi in filtreerpapier-toets *% A. pisi in filter paper test*	20	28
b) % zieke planten na uitzaaien *% diseased plants after sowing*	9	16

B. Veldproeven in 1956

Ter beschikking stonden twee partijen zaad van het ras Eminent, één uit 1954 met ruim 80% *Ascochyta pisi* en één uit 1955 met bijna 4% aantasting. Hieruit werden 3 soorten zaaizaad met verschillend percentage aantasting samengesteld, nl.

1e. zwaar aangetast zaad, ±80% *Ascochyta.*

2e. „matig" aangetast zaad, met 30% *Ascochyta*, samengesteld uit 1 deel zwaar aangetast zaad + 2 delen uit de bijna gezonde partij.

3e. „licht" aangetast zaad, met ± 10% *Ascochyta*, verkregen door aan de bijna gezonde partij wat zaad uit de zwaar zieke partij toe te voegen.

Het zaad werd geweekt in glazen bakken, met 2½ liter oplossing per kg zaad. De concentratie van de rimocidine-oplossing (sulfaat, zuiver), bedroeg 100 p.p.m., van de pimaricine-oplossing 60 p.p.m. (ruw, 92%). Het weken had plaats gedurende 24 uur bij kamertemperatuur.

Het zaaien had plaats op 23 maart op zware kleigrond nabij het laboratorium. Per object werd 2½ kg zaad uitgezaaid op een veldje van 12 bij 8 meter (250 kg/ha), de rijenafstand bedroeg 35 cm en de afstand in de rij gemiddeld 2⅔ cm. De met antibioticum behandelde objecten waren op een afstand van meer dan 100 meter gelegen van de met water behandelde objecten. De objecten waren gescheiden door 3 meter brede stroken haver. Tijdens het groeiseizoen werden waarnemingen verricht betreffende het voorkomen van symptomen. De zomer was regenrijk en gaf aan *Ascochyta pisi* alle kansen. Het gewas groeide vrij normaal op tot 19 juli, toen het veld door zeer hoge regenval en onvoldoende drainage blank kwam te staan. Deze zeer ongunstige situatie duurde tot eind juli, zodat de peulen in het water lagen en de stengels verrotten. De oogst had begin augustus plaats. Daarna stond het gewas nog ruim 3 weken op ruiters op het veld, voordat het binnengehaald werd. De kwaliteit der zaden

had door de wateroverlast zeer geleden: er kwamen veel reeds gekiemde en zwartgevlekte erwten in voor. Deze werden verwijderd vóór de *Ascochyta*-bepaling.

TABEL 29. Resultaten veldproeven 1956. Zaaizaad van het ras Eminent gedurende 24 uur geweekt in rimocidine-sulfaat 100 p.p.m., pimaricine, ruw 92 %, 60 p.p.m. of water.

Table 29. Results field trials 1956. Seed for sowing of the variety Eminent soaked for 24 hours in rimocidin sulphate 100 p.p.m., pimaricin, crude 92 %, 60 p.p.m. or water.

	rimocidine			pimaricine	water		
percent. A. pisi in zaaizaad *percent. A. pisi in seed for sowing*	10	30	80	80	10	30	80
percent. opgekomen planten *percent. of plants emerged*	77	66	48	47	79	66	52
zieke planten, in % van zaden, op 8/5 *diseased plants, in % of seeds, on 8/5*	0	0	0	0,3	2,0	6,7	14,3
zieke planten, in % van zaden, op 6/6 *diseased plants, in % of seeds, on 6/6*	0	0,2	2	0,3	2,5	10,3	19,2
percent. peulen met vlekken (na oogst) *percent. of pods with spots (after harvest)*	1	3	8	7	11	25	48
opbrengst in kg *yield in kg*	8,0	8,9	6,1	7,3	5,6	4,6	5,6
beoordeling geoogst zaad: *assessment of seed harvested:*							
a) % A. pisi in filtreerpapier-toets *% A. pisi in filter paper test*	5	7	20	22	33	51	52
b) % zieke planten na uitzaaien *% diseased plants after sowing*	0,5	2	6	9	6	12	17

Uit deze veldproeven blijkt dat *Ascochyta pisi*, na weken van het zaaizaad in rimocidine, in belangrijke mate onderdrukt kan worden. Het aantal zieke planten in de met rimocidine behandelde objecten was zo laag, dat een snelle opbouw van de *Ascochyta*-populatie niet mogelijk was. Het effect van rimocidine op het aantal zieke planten is ook aanzienlijk beter dan in 1955, toen het zaad volgens de slurry-methode behandeld werd. Ook het percentage peulen met vlekken van *Ascochyta pisi* is in de met antibiotica behandelde objecten na de oogst nog zeer gering. Aangezien de schimmel ook voorkwam op de peulen zonder dat karakteristieke vlekken gevormd waren (hoofdstuk I, 6), is het totale percentage aangetaste peulen echter groter. Dientengevolge ziet ook de aantasting der zaden er minder gunstig uit dan men op grond van het aantal peulen met vlekken zou verwachten. Vooral bij die objecten, waar van een extreem hoog percentage *Ascochyta pisi* in het zaaizaad uitgegaan is, was de aantasting van de geoogste zaden ook bij de behandelde objecten nog aanzienlijk. De objecten met een meer normale aantasting, zoals ook in de praktijk voorkomt, vertoonden echter na behandeling een belangrijk verminderde aantasting.

5. EFFECT VAN DE ANTIBIOTICA OP KIEMING VAN HET ZAAD, ONTWIKKELING VAN DE PLANT EN OPBRENGST

Het effect van de antibiotica op de kieming der zaden werd nagegaan in de filtreerpapier-toets, in kas- en in veldproeven. In de filtreerpapier-toets werd gelet op het al dan niet kiemen der zaden en de lengte van het worteltje na een bepaald aantal dagen. In tabel 30 zijn de gegevens weergegeven uit een proef, waarin per object 50 gezonde zaden gedurende 24 uur geweekt werden in diverse concentraties van het antibioticum.

TABEL 30. Kieming en wortellengte in cm bij in rimocidine-sulfaat of pimaricine, ruw 92%, geweekte zaden. Ras Eminent, gezond, 24 uur geweekt en daarna uitgelegd op vochtig filtreerpapier; beoordeeld na 3 dagen. 50 zaden per object.

Table 30. Germination and root length in cm of seeds, soaked in rimocidin sulphate or pimaricin, crude 92%. Variety Eminent, healthy, soaked for 24 hours and laid out on moist filter paper; assessment after 3 days. 50 seeds per treatment.

concentratie (p.p.m.) *concentration (p.p.m.)*	% gekiemde zaden *% germinated seeds*		gemiddelde wortellengte *mean root length*	
	rimocidine	pimaricine	rimocidine	pimaricine
0	100	100	2,3	2,3
25	–	100	–	2,4
50	–	100	–	2,2
75	100	100	2,3	2,2
100	100	100	2,5	2,3
125	–	100	–	2,2
150	100	96	2,3	1,9
200	96	98	1,8	1,4
300	92	–	1,3	–

Het antibioticum pimaricine geeft bij 150 p.p.m. een lichte remming van de kieming, rimocidine bij 200 p.p.m. Bij deze concentratie loopt ook het percentage gekiemde zaden iets, doch slechts zeer weinig, terug. Dat rimocidine bij

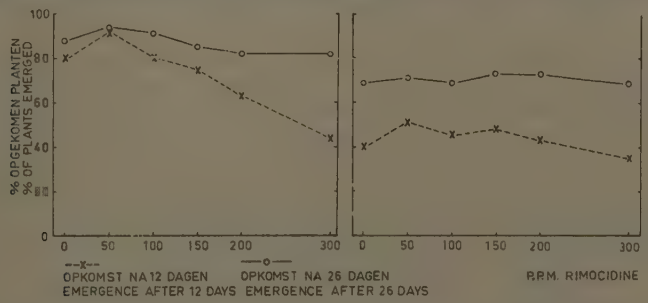


FIG. 30. Opkomst na weken der zaden gedurende 24 uur in diverse concentraties rimocidine, ruw 76%. Links: uit 100 gezonde zaden, ras Rondo. Rechts: uit 150 aangetaste zaden, ras Eminent.
Emergence after soaking the seeds in different concentrations of rimocidin, crude 76%, for 24 hours. Left: from 100 healthy seeds, variety Rondo. Right: from 150 infected seeds, variety Eminent.

hoge concentraties de kieming enigszins vertraagt, werd ook waargenomen in kasproeven, waarbij de zaden uitgezaaid werden in gestoomde grond (fig. 30).

Ook hier blijkt 75–100 p.p.m. rimocidine, de tegen *Ascochyta pisi* werkzame concentratie in vivo, de kieming niet nadeling te beïnvloeden. Bij 200 en 300 p.p.m. treedt een vertraging van de kieming op, doch, zoals uit de figuur blijkt, wordt ook bij deze hoge concentratie de uiteindelijke opkomst weinig verminderd. Bij zieke zaden treedt dit vertragend effect minder sterk naar voren; waarschijnlijk wordt het min of meer gecompenseerd door het voor het zaad gunstige effect op de verhouding zaad-parasiet. Dit vertragend effect bij hogere concentraties dan 100 p.p.m. treedt niet altijd in even sterke mate op. Soms is het zeer gering (tabel 31) of zelfs afwezig tot een concentratie van 300 p.p.m. In tabel 31 is de opkomst in gestoomde grond van gezond Eminent zaad, geweekt in diverse concentraties rimocidine vergeleken met de opkomst van in pimaricine geweekt zaad.

TABEL 31. Opkomst na 7 en 10 dagen van zaden, welke gedurende 24 uur geweekt zijn in diverse concentraties rimocidine-sulfaat of pimaricine, ruw 92%. Per object 100 gezonde zaden, ras Eminent.

Table 31. Emergence, after 7 and 10 days, of seeds soaked in various concentrations of rimocidin sulphate or pimaricin, crude 92%, for 24 hours. Per treatment 100 healthy seeds, variety Eminent.

concentratie (p.p.m) *concentration (p.p.m.)*	% opgekomen planten % *plants emerged*			
	rimocidine		pimaricine	
	na 7 dagen *after 7 days*	na 10 dagen *after 10 days*	na 7 dagen *after 7 days*	na 10 dagen *after 10 days*
0	96	99	94	98
50	–	–	96	100
75	99	99	–	–
100	94	98	97	99
150	95	97	86	99
200	93	98	83	98
400	81	95	–	–

Ook voor pimaricine geldt dus dat weken in een hoge concentratie (met name 150 en 200 p.p.m.) enige vertraging van de kieming geeft. Het totale aantal opgekomen planten is echter ook bij deze concentraties niet of nauwelijks minder dan bij de controles.

In de beide bovengenoemde proeven respectievelijk op filtreerpapier en in gestoomde grond (tab. 30, tab. 31) trad enige kiemremming op na weken in rimocidine 200 p.p.m. of pimaricine 150 p.p.m. Daar met een oplossing van 75 p.p.m. van de zuivere stof reeds een goede ontsmetting verkregen wordt is een ruime marge aanwezig tussen de dosis curativa en de dosis tolerata.

Om de invloed van een antibioticumbehandeling der zaden op de ontwikkeling der planten en de opbrengst na te gaan, werden enkele proeven genomen, waarbij het gewas werd opgekweekt in Mitscherlichpotten. De potten werden gevuld met een grondmengsel, bestaande uit 2 delen ongestoomde klei en 1 deel gestoomde grond, beide gezeefd door een 5 mm zeef. Hierdoorheen zijn ASF korrels gemengd, N.P.K. = 12:10:18, in een hoeveelheid van 2 gram per pot. De maximale watercapaciteit van dit grondmengsel bedroeg 45%. De water-

capaciteit van de grond op het moment, waarop de potten gevuld werden, bedroeg 33%. Dit watergehalte van de grond werd gedurende de gehele proef gehandhaafd door de potten geregeld te wegen, en het verloren gewicht bij te vullen met water. Deze proef werd begin april 1955 ingezet.

Als zaaizaad werd gebruikt gezond en zwaar aangetast zaad van het ras Eminent, behandeld met rimocidine in de vorm van een slurry. Per object werden 64 zaden uitgezaaid, in 8 potten. De 64 zaden uit één object werden geschud met een papje, bestaande uit 100 mg rimocidine (ruw, 76%), 25 mg carboxy-methylcellulose en 0,25 cc water. De objecten waren:

1. gezond zaad, onbehandeld.
2. gezond zaad, met rimocidine behandeld.
3. aangetast zaad, onbehandeld.
4. aangetast zaad, met rimocidine behandeld.

De oogst had begin juli plaats. De aan deze planten verrichte waarnemingen en berekeningen zijn weergegeven in tabel 32.

TABEL 32. Gegevens over planten, opgegroeid uit onbehandelde en met rimocidine (slurry) behandelde zaden. Per object 8 potten, elk met 8 zaden. Ras Eminent.

Table 32. Data on plants, grown from untreated seeds and from seeds treated with rimocidin (slurry). Per treatment 8 pots, each with 8 seeds. Variety Eminent.

	gezond zaad/*healthy seed*		ziek zaad/*diseased seed*	
	onbehandeld *control*	rimocidine *rimocidin*	onbehandeld *control*	rimocidin *rimocidin*
aantal opgekomen planten . . . *number of plants emerged*	63	62	32	32
aantal bladeren per plant op 29/4 . *number of leaves per plant on 29/4*	3,9	4,0	3,7	3,9
aantal bladeren per plant op 13/5 . *number of leaves per plant on 13/5*	7,5	7,4	7,0	7,2
lengte planten in cm op 29/4 . . . *length of plants in cm on 29/4*	7,8	7,7	6,6	7,4
lengte planten in cm op 13/5 . . . *length of plants in cm on 13/5*	30,6	32,3	26,6	35,1
lengte planten in cm op 4/7 . . . *length of plants in cm on 4/7*	39,3	45,7	47,1	48,0
aantal peulen per plant . . . . . *number of pods per plant*	2,8	3,0	3,5	3,9
aantal zaden per peul . . . . . *number of seeds per pod*	3,4	3,3	4,3	4,1
opbrengst in gram . . . . . *yield in gms*	168,5	167,6	138,7	144,3

Uit de tabel blijkt, dat de opkomst van sterk door *Ascochyta pisi* aangetast zaad veel slechter is dan die van gezond zaad. Ook rimocidinebehandeling brengt hierin geen verbetering. Het antibioticum kan klaarblijkelijk een door *Ascochyta pisi* ten dode gedoemd kiempje niet meer redden. De waarde van een rimocidinebehandeling moet dan ook niet gezocht worden in de verbetering van de opkomst, doch in een vermindering van het aantal zieke plantjes, die als verspreidingsbron fungeren. Verder blijkt uit vergelijking van kolom 1 met kolom 2, dat behandeling van gezond zaaizaad met rimocidine noch op de ontwikkeling van de plant noch op de opbrengst een zodanige invloed heeft, dat betrouwbare verschillen met het onbehandelde object ontstaan.

Dit geldt eveneens voor het zieke zaad, hoewel hier de tendens aanwezig is, dat de lengte der planten in het onbehandelde object kleiner is dan in het behandelde. Dat de planten uit ziek zaad zich uiteindelijk sterker ontwikkelen dan die uit gezond zaad moet toegeschreven worden aan het geringer aantal planten per pot.

Op gelijke wijze werd in 1956 een meer uitgebreide proef uitgevoerd; behalve van zwaar aangetast zaad werd nu ook gebruik gemaakt van matig aangetast zaad (30%) en licht aangetast zaad (10%). Naast rimocidine werd ook het antibioticum pimaricine beproefd. Daar met de slurry-behandeling wisselende resultaten verkregen waren, werden de zaden nu geweekt in 100 p.p.m. rimocidine-sulfaat, 60 p.p.m. pimaricine of water. De proef werd uitgezaaid op 15 maart 1956, en geoogst op 4 juli. De resultaten zijn weergegeven in tabel 33.

TABEL 33. Gegevens over planten uit licht (10%), matig (30%) en zwaar (80%) aangetaste zaden, die gedurende 24 uur geweekt waren in water, rimocidine-sulfaat 100 p.p.m. of pimaricine, ruw 92%, 60 p.p.m. Ras Eminent, 64 zaden per object.

Table 33. Data on plants, grown from slightly (10%), moderately (30%) and heavily (80%) infected seeds, which were soaked in water, rimocidin sulphate 100 p.p.m. or pimaricin, crude 92%, 60 p.p.m. for 24 hours. Variety Eminent, 64 seeds per treatment.

	10%			30%			80%		
	water	rimo-cidine	pima-ricine	water	rimo-cidine	pima-ricine	water	rimo-cidine	pima-ricine
aantal planten *number of plants*	63	63	64	54	43	49	24	20	16
lengte planten in cm op 25/4 *length of plants in cm on 25/4*	12,8	11,9	12,5	11,3	11,6	10,2	8,4	7,9	9,4
lengte planten in cm op 14/5 *length of plants in cm on 14/5*	31,8	33,2	33,8	34,4	36,3	36,5	33,7	32,1	35,8
aantal peulen per plant *number of pods per plant*	2,8	2,7	2,8	3,0	3,4	3,5	4,0	3,9	4,4
aantal zaden per peul *number of seeds per pod*	3,4	3,6	3,2	3,7	3,7	3,7	4,1	4,3	4,2
opbrengst in gram *yield in gms*	159	154	150	155	150	165	109	86	73
gewicht zaden per plant in gram *weight of seeds per plant in gms*	2,5	2,4	2,3	2,9	3,5	3,4	4,5	4,3	4,5

Bij het licht aangetaste zaad treden tengevolge van de antibioticumbehandeling geen verschillen op met in water geweekt zaad. Bij het matig en zwaar aangetaste zaad is de opkomst bij de met antibioticum behandelde objecten in deze niet steriele grond iets lager. Bij een herhaling van deze proef met een groter aantal zaden werden evenwel geen betrouwbare verschillen in opkomst gevonden. De andere grootheden in tabel 33 geven geen betrouwbare verschillen tussen behandeld en onbehandeld te zien.

Ook in veldproeven met de rassen Rondo en Eminent, die met rimocidine waren behandeld, werd geen schade van deze behandeling geconstateerd.

6. INWENDIGE ZAADONTSMETTING MET ANTIBIOTICA IN VERGELIJKING MET MIDDELEN OP BASIS VAN TETRAMETHYLTHIURAMDISULFIDE EN ORGANISCHE KWIKVERBINDINGEN

De werking van de antibiotica rimocidine en pimaricine werd vergeleken met die van de in de practijk bij erwtezaden gebruikte ontsmettingsmiddelen op basis van tetramethylthiuramdisulfide (TMTD) en organisch kwik. Van deze middelen zegt De Tempe (1955): „Van ouds is bekend, dat ontsmetting van het zaad practisch niets uitricht tegen *Ascochyta* en *Mycosphaerella*". Hij illustreert dit aan een proef op filtreerpapier met niet gesorteerde tuinbouwerwten (tab. 34).

Tabel 34. Percentage Ascochyta + Mycosphaerella in 6 monsters tuinbouwerwten na behandeling met diverse zaadontsmetters. Filtreerpapier-toets (naar De Tempe).

Table 34. Percentage Ascochyta + Mycosphaerella in 6 samples of horticultural peas after treatment with various seed disinfectants. Filter paper test (according to De Tempe).

	Ascochyta + Mycosphaerella
onbehandeld/*untreated* . .	59%
kwik I/*mercury I*	51%
kwik II/*mercury II*	51%
phygon	51%
TMTD	51%

Ook in onze proeven werd geen sterk effect met deze middelen verkregen (tab. 35).

Tabel 35. Aantal zieke planten uit zwaar aangetast Eminent zaad, na behandeling met middelen op basis van TMTD (aatiram) en organisch kwik (germisan), in vergelijking met het effect na behandeling met rimocidine.

Table 35. Number of diseased plants from heavily infected seed, variety Eminent, after treatment with aatiram (TMTD) and germisan (organic mercury), in comparison with the effect of a treatment with rimocidin.

	aantal zaden *number of seeds*	zieke planten *diseased plants*
onbehandeld/*untreated* . .	200	61
aatiram	200	44
rimocidine	200	3
onbehandeld/*untreated* . .	100	16
germisan-droog/*dry* . . .	100	13
rimocidine	100	0

De behandeling met het antibioticum geschiedde door de zaden 24 uur in een oplossing van 100 p.p.m. te weken, die met aatiram en kwik door de zaden te schudden met een hoeveelheid poeder overeenkomend met 2 gram/kg zaad, zoals dat in de practijk plaats heeft. Ook wanneer de zaden geweekt werden in een suspensie van TMTD, 100 p.p.m., bleek in de filtreerpapier-toets het percentage zaden met mycelium nog 65% te bedragen tegenover 70% in de controle.

Het is duidelijk dat met de TMTD- en kwikmiddelen alleen het oppervlakkig aanwezig zijnde mycelium gedood wordt, en dat deze middelen derhalve het zaad onvoldoende ontsmetten tegen *Ascochyta* en *Mycosphaerella*.

7. BESPREKING

Bij de behandeling van door *Ascochyta pisi* aangetaste erwtezaden met rimocidine en pimaricine had toediening van de antibiotica op verschillende wijze plaats. Met weken in een oplossing werd steeds een zeer goed resultaat verkregen. Dit is echter een voor de practijk omslachtige methode; onderzoekers in Zweden evenwel achten uitzaaien van geweekte en teruggedroogde erwten practisch uitvoerbaar. Veel eenvoudiger echter zou een behandeling met een „slurry", of een geconcentreerde suspensie in methanol zijn; beide zijn min of meer te vergelijken met een droogbehandeling. Hoewel met deze methodes ook duidelijke, en soms zelfs zeer goede resultaten verkregen werden, was het effect hiervan meestal minder goed dan met weken. Met deze laatste methode werd het aantal zieke planten in kasproeven met ongeveer 95% verminderd, zonder dat een schadelijke werking viel waar te nemen. In de veldproeven van 1956 was dit resultaat zeker niet ongunstiger. Het is echter niet gelukt een 100% ontsmetting te verkrijgen zonder een schadelijk effect op de kieming.

In hoofdstuk I is beschreven dat één goed sporulerende zieke plant in een voor de schimmel gunstig seizoen ongeveer 1 m^2 van een vatbaar ras zwaar kan aantasten, hetgeen overeenkomt met een percentage zieke planten van ruim 1%, berekend op het aantal uitgezaaide zaden. Wanneer we zouden uitgaan van voor 20% aangetast zaaizaad – zaad met een hoger ziektepercentage zal in de practijk zelden als zaaizaad gebruikt worden –, dan kunnen we hieruit ongeveer 5% zieke planten verwachten, en na weken in rimocidine of pimaricine 0,25%. Daar sommige planten na korte tijd doodgaan, en andere slechts weinig aangetast zijn, kunnen we dit percentage wel ongeveer gelijkstellen met 0,1% goed sporulerende planten. Op grond van de uit de verspreidingsproeven verkregen gegevens lijkt het aannemelijk, dat zelfs in een regenachtig seizoen dit percentage te laag is voor een voldoende opbouw van de schimmelpopulatie over het gehele veld. Deze berekening is in overeenstemming met de in de veldproeven gevonden resultaten. Bij de objecten, waarin uitgegaan is van 10 en 30% aantasting in het zaaizaad, is een sterk effect van de behandeling met antibioticum waar te nemen, doch bij zaaizaad met 80% aantasting is het uiteindelijke effect onvoldoende. Bovendien dient hierbij vermeld te worden dat de bovenstaande berekeningen en resultaten betrekking hebben op een voor *Ascochyta pisi* zeer vatbaar erwteras, in een voor deze schimmel gunstig seizoen.

Behalve de in hoofdstuk II genoemde verschillen in vitro tussen rimocidine en pimaricine, kwamen ook bij de zaadbehandeling verschillen naar voren. Pimaricine remde in een concentratie van 150 p.p.m. de kieming der zaden reeds enigszins, doch rimocidine pas bij 200 p.p.m. Daarnaast werd waargenomen dat pimaricine ook in een iets lager concentratie werkzaam was.

HOOFDSTUK IV

NADER ONDERZOEK BETREFFENDE DE INWENDIGE WERKING VAN RIMOCIDINE EN PIMARICINE

1. INLEIDING

Uit het voorgaande hoofdstuk is gebleken dat door *Ascochyta pisi* aangetaste erwtezaden met goed resultaat door de antibiotica rimocidine en pimaricine ontsmet kunnen worden. Evenwel geeft een gering percentage der aangetaste zaden ook na ontsmetting nog zieke planten. In dit hoofdstuk is getracht dit verschijnsel nader te belichten.

Na bespreking van het gebruikte materiaal en de gevolgde methodes (IV, 2) zal de binding van de antibiotica aan het weefsel van de zaden behandeld worden (IV, 3) en vervolgens het binnendringen der antibiotica in de zaden, bepaald volgens de extractiemethode (IV, 4). In IV, 5 zal nagegaan worden in hoeverre de schimmel in het zaad onderdrukt wordt en welke factoren hierop invloed uitoefenen, waarna de verkregen resultaten besproken zullen worden (IV, 6).

2. MATERIAAL EN METHODIEK

Tenzij anders vermeld is in dit hoofdstuk uitsluitend zuiver rimocidine-sulfaat en zuivere pimaricine gebruikt.

Zowel de aangetaste als de gezonde zaden waren van het ras Eminent.

De extractie der zaden had plaats met methanol. Het apparaat waarmee de extractie uitgevoerd werd bestaat uit een erlenmeyer van 500 ml, in de mond waarvan een koeler aangebracht is. Aan deze koeler hangt een emmertje, waarin de te extraheren stof gebracht wordt, gewikkeld in filtreerpapier. Op de bodem van de erlenmeyer bevindt zich het extractiemiddel, dat bij verwarming verdampt, tegen de koeler condenseert, en in het emmertje terugdruipt; wanneer dit bijna vol is, treedt een hevel in werking, waarna de extractie opnieuw begint. Extraheren gedurende 3 kwartier bleek voldoende. Door aan het einde van deze periode één of meer emmertjes vloeistof te verwijderen, telkens voordat de hevel in werking treedt, wordt de duur van het hierop volgende indampen in Claisen-kolven aanmerkelijk bekort. Gewerkt is met een serie van 6 van deze apparaten op een waterbad.

Het tot een fractie van een cm^3 ingedampte extract werd op een schijfje filtreerpapier met een diameter van 9 mm gebracht; dit werd in een petrischaal met agar gelegd, waarin sporen van *Aspergillus niger* uitgezaaid waren. Na een etmaal werd de diameter van de remmingszone, verminderd met die van het schijfje, genoteerd.

Daar tijdens de extractie en het indampen verliezen aan antibioticum optreden en mogelijk niet al het in het zaad aanwezige antibioticum door extractie vrij-

komt, werden naast elke bepaling een reeks controle bepalingen uitgevoerd. Hiervoor werden in water geweekte erwten gebruikt, waaraan, na fijnwrijven in een mortier, bekende hoeveelheden antibioticum toegevoegd werden vóór het begin van de extractie. De verliezen tengevolge van extractie en indampen treden dan ook in de controles op, zodat vergelijking van de remmingszones mogelijk wordt.

3. BINDING AAN HET WEEFSEL VAN HET ZAAD

Bij het zoeken naar een methode om het antibioticum rimocidine in het zaad te kunnen aantonen, werd aanvankelijk het volgende beproefd. De cotylen en kiempjes van in rimocidine geweekte zaden werden uitgelegd op een voedingsbodem van havermoutagar, waarin sporen van *Aspergillus niger* uitgezaaid waren. Na bebroeding gedurende 24 uur bij 24°C, werd nagegaan of om de zaaddelen een remmingszone ontstaan was, teneinde de grootte hiervan te vergelijken met de remmingszones, veroorzaakt door bekende hoeveelheden rimocidine in schijfjes filtreerpapier. Doorgaans verschenen er echter geen remmingszones om cotylen en kiempjes uit zaden, die gedurende 24 uur in rimocidine 100 p.p.m. geweekt waren, terwijl dit toch de concentratie was, die een zo sterk ontsmettende werking tegen inwendig in het zaad aanwezig mycelium uitoefende. Wel werden remmingszones verkregen wanneer de zaden in hogere concentraties geweekt werden, nl. van 200–1000 p.p.m. Soms ontstonden er ook kleine en een enkele maal zelfs grote remmingszones om in water geweekte zaden, mogelijk tengevolge van antibiotica, spontaan door microörganismen in de oplossing gevormd. Het feit dat doorgaans geen remmingszones ontstonden na weken der zaden in een oplossing van 100 p.p.m. kon drie oorzaken hebben:

1. De rimocidine dringt bij weken in een oplossing van 100 p.p.m. niet in voldoende mate in de cotylen of het kiempje door.
2. Het antibioticum dringt wel in voldoende mate binnen, doch het wordt geïnactiveerd.
3. Het antibioticum dringt binnen, doch er treedt een zodanige binding aan het weefsel van het zaad op, dat het moeilijk in de agar diffunderen kan.

De eerste mogelijkheid leek niet waarschijnlijk, daar in dat geval moeilijk te begrijpen zou zijn, hoe *Ascochyta pisi* in het zaad gedood wordt. Verder werd gevonden dat ook wanneer rimocidine wèl in voldoende mate in het erwteweefsel aanwezig was, er toch geen remmingszone ontstond. Dit bleek uit de volgende proef. Twee in water gezwollen erwten werden afzonderlijk fijngewreven in een mortier. Aan de eerste werd 60, aan de tweede 600 γ rimocidine toegevoegd. Daar het volume van een gezwollen erwt $\pm$ 400 mm^3 bedraagt, betekent dit dat de antibioticumconcentratie in de papjes 150, respectievelijk 1500 p.p.m. was. De papjes werden nu elk in een glazen ringetje van 13 mm diameter op een petrischaal met *Aspergillus niger* gebracht. Er ontstonden geen remmingszones, terwijl om de controleringetjes, waarin een evengrote hoeveelheid antibioticum in water aangebracht was, doch nu zonder erwteweefsel, grote remmingszones ontstonden. In dit geval moet er dus sprake zijn van inactivering door of adsorptie aan het erwteweefsel. Dit is onderzocht door een dergelijk erwtepapje, waaraan 600 γ rimocidine toegevoegd was gedurende 1½ uur met methanol te extraheren. Het extract werd in een Claisen-kolf ingedampt tot een fractie van

één cm^3, en gebracht op een schijfje filtreerpapier van 9 mm diameter. Dit veroorzaakte op een petrischaal met *Aspergillus niger* een grote remmingszone. Het antibioticum was dus na toevoeging aan het erwtepapje niet onwerkzaam geworden, zodat de mogelijkheid van totale inactivering vervalt, en we een binding aan het weefsel moeten aannemen, die diffusie in de agar verhindert of remt.

Ook voor pimaricine kon een dergelijke binding geconstateerd worden, evenwel in mindere mate dan voor rimocidine. Dit bleek uit het feit, dat om cotylen uit zaden, die gedurende 24 uur in een pimaricineoplossing van 75 p.p.m. geweekt waren en daarna uitgelegd in een petrischaal met sporen van *Aspergillus niger*, wel een remmingszone ontstond. Daar per erwt van beide antibiotica ongeveer een gelijke hoeveelheid opgenomen wordt (IV, 4), volgt hieruit dat rimocidine in sterkere mate aan het weefsel gebonden wordt dan pimaricine.

4. BINNENDRINGEN IN HET ZAAD

Zoals uit het voorgaande blijkt, kan rimocidine tengevolge van binding aan het weefsel, moeilijk aangetoond worden door uitleggen der zaden op een voedingsbodem met een voor dit antibioticum gevoelige schimmel. Met behulp van methanol kan het echter uit zaden geëxtraheerd worden. Daarom is langs deze weg het binnendringen van beide antibiotica in het zaad nader onderzocht.

Op de hiervoor beschreven wijze is nagegaan hoeveel rimocidine respectievelijk pimaricine aangetoond kon worden in een drietal gezonde erwten, die gedurende 24 uur in een 100 p.p.m. oplossing van een van beide antibiotica geweekt waren (tab. 36).

TABEL 36. Bepaling van de hoeveelheid antibioticum in het zaad. De extracten van zaden, die gedurende 24 uur geweekt zijn in 100 p.p.m. rimocidine-sulfaat of pimaricine, vergeleken met die van een standaardreeks. Remmingszones in Aspergillus niger.

Table 36. Assessment of the amount of antibiotics in the seed. The extracts of seeds, soaked in 100 p.p.m. rimocidin sulphate or pimaricin for 24 hours, compared with those of a standard range. Inhibition zones in Aspergillus niger.

3 erwten, geweekt in: *3 peas, soaked in:*	toegevoegd: *added:*	remmingszones in mm *inhibition zones in mm*
rimocidine 100 p.p.m.	–	8
water	10γ rimoc.	1
water	20γ rimoc.	5
water	50γ rimoc.	9
pimaricine 100 p.p.m.	–	11
water	10γ pimar.	4
water	20γ pimar.	8
water	50γ pimar.	12

Zowel bij rimocidine als bij pimaricine blijkt ongeveer 40 γ in 3 erwten aangetoond te kunnen worden, d.i. 13 γ per erwt. Verder valt in de bovenstaande tabel op, dat alle remmingszones in de proef met pimaricine groter zijn dan die in de proef met rimocidine, hoewel de hoeveelheid aanwezig antibioticum gelijk is. Ook in de proeven met schijfjes filtreerpapier gaf pimaricine groter remmingszones dan rimocidine (hoofdstuk II, 3).

Wanneer we de hoeveelheid binnengedrongen antibioticum (13 γ) uitdrukken in delen per millioen, betrokken op het volume van een gezwollen erwt (0,4 cm^3), dan komen we voor beide antibiotica op een concentratie van ongeveer 33 p.p.m. Het antibioticum is echter niet gelijkelijk over het zaad verdeeld, zoals blijkt uit de onderstaande proeven.

Een aantal gezonde erwten, ras Eminent, werd gedurende 24 uur geweekt in 100 p.p.m. rimocidine, respectievelijk pimaricine. Hierna werd van de kiempjes, zaadhuiden en cotylen elk 0,5 gram genomen en geëxtraheerd. De door de extracten veroorzaakte remmingszones in *Aspergillus niger* werden vergeleken met die van een standaardreeks, bestaande uit zaden die na weken in water werden gepeld en fijngemaakt, en waaraan vóór de extractie 10, 20 of 50 γ antibioticum per erwt toegevoegd werd (tab. 37).

TABEL 37. Verdeling van het antibioticum in het zaad. De extracten van gelijke gewichten aan cotylen, kiempjes en zaadhuiden vergeleken met die van een standaardreeks. Zaden gedurende 24 uur geweekt in 100 p.p.m. rimocidine-sulfaat of pimaricine. Remmingszones in Aspergillus niger.

Table 37. Distribution of the antibiotics in the seed. The extracts of equal weights of cotyledons, embryos and seed coats compared with those of a standard range. Seeds soaked in 100 p.p.m. rimocidin sulphate or pimaricin for 24 hours. Inhibition zones in Aspergillus niger.

0,5 gram *0,5 gms*	zaad geweekt in 100 p.p.m.: *seed soaked in 100 p.p.m.:*	toegevoegd *added*	remmingszone *inhibition zone*	berekende concentratie in het zaad *calculated concentration in the seed*
cotylen/*cotyledons* . .	rimocidine	–	0 mm	20 p.p.m.
kiempjes *embryos* . . .	rimocidine	–	6 mm	75 p.p.m.
zaadhuiden/*seed coats* .	rimocidine	–	6 mm	75 p.p.m.
cotylen/*cotyledons* . .	water	10γ rimocidine	0 mm	–
cotylen/*cotyledons* . .	water	20γ rimocidine	5 mm	–
cotylen/*cotyledons* . .	water	50γ rimocidine	8 mm	–
cotylen/*cotyledons* . .	pimaricine	–	5 mm	25 p.p.m.
kiempjes *embryos* . . .	pimaricine	–	11 mm	75 p.p.m.
zaadhuiden/*seed coats* .	pimaricine	–	10 mm	50 p.p.m.
cotylen/*cotyledons* . .	water	10γ pimaricine	6 mm	–
cotylen/*cotyledons* . .	water	20γ pimaricine	10 mm	–
cotylen/*cotyledons* . .	water	50γ pimaricine	12 mm	–

Uit deze tabel blijkt dat voor beide antibiotica de concentratie in de zaadhuid en de kiempjes aanmerkelijk hoger ligt dan in de cotylen. Daar voor rimocidine in één paar cotylen juist geen antibioticum aangetoond kon worden, is deze proef herhaald met 3 paar cotylen; per paar bleek toen 8 γ antibioticum aanwezig te zijn, hetgeen ongeveer overeenkomt met een concentratie van 20 p.p.m.

Ook tussen de binnenste en de meer naar buiten gelegen delen der cotylen is een duidelijk verschil in antibioticumconcentratie waar te nemen. Van beide werd 1,5 gram apart geëxtraheerd, nadat de zaden 24 uur in een antibioticumconcentratie van 100 p.p.m. geweekt waren (tab. 38).

Wanneer we deze remmingszones vergelijken met die van de standaardreeksen in tabel 37, dan kunnen we hieruit berekenen dat de rimocidineconcentratie in de buitenhelft bijna 30 p.p.m., en in de binnenhelft minder dan 8 p.p.m. is.

TABEL 38. Verdeling van het antibioticum in het zaad. De extracten van de binnen- en buitenhelft van cotylen vergeleken met die van een standaardreeks. Zaden 24 uur geweekt in 100 p.p.m. rimocidine-sulfaat of pimaricine. Remmingszones in Aspergillus niger.

Table 38 Distribution of the antibiotics in the seed. The extracts of the inner and outer half of the cotyledons compared with those of a standard range. Seeds soaked in rimocidin sulphate or pimaricin for 24 hours. Inhibition zones in Aspergillus niger.

zaden geweekt in: *seeds soaked in:*	extractie van 1½ gram: *extraction of 1½ gms:*	remmingszones *inhibition zones*
rimocidine 100 p.p.m.	buitenhelft/*outer half*	7 mm
rimocidine 100 p.p.m.	binnenhelft/*inner half*	0 mm
pimaricine 100 p.p.m.	buitenhelft/*outer half*	11,5 mm
pimaricine 100 p.p.m.	binnenhelft/*inner half*	2 mm

Voor pimaricine vinden we in deze proef concentraties van ruim 35, respectievelijk 5 p.p.m. In de binnenhelft dringt dus veel minder antibioticum binnen.

De bovenstaande proeven zijn alle genomen met niet of niet merkbaar door *Ascochyta pisi* aangetaste zaden, daar de mate van aantasting invloed heeft op de zwelling van het zaad (fig. 31), en mogelijk ook op de mate, waarin het antibioticum binnendringt.

Door GRÜMMER & MACH (1955) is nl. aangetoond, dat de antibiotica patuline en streptomycine beter binnendringen in door *Colletotrichum lindemuthianum* aangetaste bonen dan in gezonde bonen. In een oriënterend onderzoek met oxytetracycline werden overeenkomstige resultaten verkregen ten opzichte van door *Ascochyta pisi* aangetaste erwtezaden. Dit onderzoek kon met oxytetracycline veel eenvoudiger geschieden dan met rimocidine. Het eerste antibioticum wordt nl. veel minder sterk aan het zaad gebonden, waardoor het mogelijk is een kleine hoeveelheid antibioticum in een stukje erwt aan te tonen, door dit uit te leggen op een met *Bacillus subtilis* bezaaide petrischaal, en de veroorzaakte remmingszone te meten. Daartoe werd elk cotyl, na 24 uur weken van het zaad in een oxytetracycline-oplossing van 100 p.p.m. in een drietal schijfjes verdeeld, en elk schijfje in een aantal kleine blokjes. Uit de gevormde remmingszones bleek, dat oxytetracycline tot in de binnenste delen van het zaad doordringt, en wel in aangetast zaad in sterkere mate dan in gezond zaad. Voorts blijkt ook dat bij een aangetast zaad in het zieke deel meer antibioticum binnendringt dan in het gezonde deel van het zaad. Hierna is met behulp van extractie getracht na te gaan of deze waarnemingen ook voor rimocidine gelden. Hiertoe werden gezonde en zieke zaden van het ras Eminent gedurende 24 uur geweekt in een 100 p.p.m. oplossing van rimocidine, respectievelijk pimaricine, en daarna gepeld. Per object werden 3 gepelde zaden geëxtraheerd; de remmingszones zijn genoteerd in tabel 39. Verder zijn uit een aantal matig aangetaste zaden de zieke delen en de overeenkomstige stukken van gezonde delen uitgesneden tot een gewicht van 1,5 gram, en eveneens geëxtraheerd (tab. 39).

Zowel rimocidine als pimaricine zijn na weken der zaden in grotere hoeveelheid in de cotylen der zieke zaden aanwezig dan in die der gezonde zaden; ook bij één aangetaste erwt blijkt in de zieke delen meer antibioticum aanwezig te zijn dan in de gezonde delen.

Verder is het binnendringen van pimaricine onderzocht bij in water voorgeweekte zaden, welke dus reeds gezwollen waren voordat ze in een oplossing van

TABEL 39. Bepaling van de hoeveelheid antibioticum in aangetaste en gezonde zaden, respectievelijk delen van het zaad. Zaden 24 uur geweekt in 100 p.p.m. rimocidine-sulfaat of pimaricine. Extracten vergeleken met die van een standaardreeks. Remmingszones in Aspergillus niger.

Table 39. Assessment of the amount of antibiotics in infected and healthy seeds, or parts of the seeds. Seeds soaked in 100 p.p.m. rimocidin sulphate or pimaricin. Extracts compared with those of a standard range. Inhibition zones in Aspergillus niger.

zaden geweekt in: *seeds soaked in:*	extractie van: *extraction of:*	remmingszones *inhibition zones*
rimocidine-sulfaat . . . . *rimocidin sulphate*	3 aangetaste, gepelde zaden *3 infected, peeled seeds*	7 mm
rimocidine-sulfaat . . . . *rimocidin sulphate*	3 gezonde, gepelde zaden *3 healthy, peeled seeds*	3 mm
rimocidine-sulfaat . . . . *rimocidin sulphate*	1,5 gram aangetaste delen *1,5 gms infected parts*	3 mm
rimocidine-sulfaat . . . . *rimocidin sulphate*	1,5 gram gezonde delen *1,5 gms healthy parts*	2 mm
pimaricine	3 aangetaste, gepelde zaden *3 infected, peeled seeds*	13 mm
pimaricine	3 gezonde, gepelde zaden *3 healthy, peeled seeds*	11 mm
pimaricine	1,5 gram aangetaste delen *1,5 gms infected parts*	13 mm
pimaricine	1,5 gram gezonde delen *1,5 gms healthy parts*	9 mm

het antibioticum geweekt werden. Het extract der cotylen gaf even grote remmingszones als het extract van cotylen uit erwten, die alleen in het antibioticum geweekt waren. Dit houdt in dat de snelle wateropneming tijdens de zwelling niet beslissend is voor de mate waarin het antibioticum binnendringt.

Tenslotte is nagegaan of ná het weken der zaden nog antibioticum vanuit de zaadhuid in de cotylen diffundeert. Hiertoe is de hoeveelheid pimaricine bepaald in cotylen van direct na het weken gepelde, en van 24 uur later gepelde zaden. Er werd slechts een klein, niet betrouwbaar verschil gevonden.

5. ONDERDRUKKING VAN ASCOCHYTA IN HET ZAAD

Om een indruk te krijgen betreffende de aanwezigheid van nog levend mycelium in de verschillende delen van het zaad na weken der zaden in rimocidine, is de volgende proef opgezet. 100 zaden werden gedurende 24 uur bij kamertemperatuur geweekt in een 100 p.p.m. rimocidine-sulfaat-oplossing. Hierna werden de zaadhuid, de cotylen en het kiempje apart uitgelegd op havermout-agar. Na 10 dagen werd bepaald op welke zaad-delen mycelium van *Ascochyta pisi* was uitgegroeid (tabel 40).

Op de zaadhuid groeide geen mycelium, maar in de cotylen of het kiempje was de schimmel bij 8 % der zaden nog niet gedood. Wanneer evenwel de zaden niet gepeld werden, was het aantal zaden waarop mycelium groeide na weken in rimocidine, aanmerkelijk lager. De tijdsduur gedurende welke de zaadhuid na de behandeling om het zaad moet blijven, om dit effect te verkrijgen is onderzocht in de volgende proef. Aangetaste erwten werden gedurende 24 uur ge-

TABEL 40. Effect van rimocidine op Ascochyta in verschillende delen van het zaad. Ras Eminent, 100 zaden, gedurende 24 uur geweekt in 100 p.p.m. rimocidine-sulfaat. Delen der zaden uitgelegd op havermoutagar.

Table 40. Effect of rimocidin on Ascochyta in different parts of the seed. Variety Eminent, 100 seeds, soaked in 100 p.p.m. rimocidin sulphate for 24 hours. Parts of the seeds laid out on oatmeal agar.

mycelium op/*mycelium on:*	aantal/*number*
alléén cotylen /*cotyledons only*	3
alléén het kiempje/*embryo only*	1
kiempje + cotylen /*embryo + cotyledons* .	4
zaadhuid /*seed coat*	0

weekt in een oplossing van 100 p.p.m. rimocidine (ruw, 76%). Onmiddellijk daarna werd een gedeelte der zaden gepeld en uitgelegd op vochtig filtreerpapier. De andere erwten werden pas na respectievelijk 2, 4, 6, 8 en 24 uur gepeld en uitgelegd, en een gedeelte niet gepeld. Als controle dienden in water geweekte erwten, die al dan niet gepeld werden. Per object werden 35 zaden gebruikt.

TABEL 41. Invloed van tijdstip, waarop geweekte zaden gepeld worden, op het percentage Ascochyta pisi volgens de filtreerpapier-toets. Ras Eminent, 24 uur geweekt in rimocidine, ruw 76%, 100 p.p.m. of water.

Table 41. Influence of time of peeling of soaked seeds on percentage of Ascochyta pisi by the filter paper test. Variety Eminent, soaked for 24 hours in rimocidin, crude 76%, 100 p.p.m. or water.

gepeld: *peeled:*	aantal zaden met mycelium na weken in: *number of seeds with mycelium after soaking in:*	
	rimocidine	water
direct na weken/*directly after soaking* .	9	18
na 2 uur/*after 2 hours*	9	–
na 4 uur/*after 4 hours*	6	–
na 6 uur/*after 6 hours*	4	–
na 8 uur/*after 8 hours*	3	–
na 24 uur/*after 24 hours*	1	–
niet gepeld/*not peeled*	1	28

Het aantal zaden, waarop mycelium uitgroeit, blijkt kleiner te worden naarmate de zaadhuid later verwijderd wordt. Ter verklaring van dit verschijnsel is gedacht aan de mogelijkheid, dat na het weken nog antibioticum vanuit de zaadhuid naar binnen zou diffunderen. Dit kon echter met behulp van extractie niet overtuigend aangetoond worden (IV, 4).

Zoals vermeld is in hoofdstuk III, 3A, werd een volledige ontsmetting verkregen, wanneer de zaden vóór het weken in rimocidine eerst 24 uur in water werden geweekt. Wanneer evenwel aan de rimocidine-behandeling slechts 8 uur weken voorafging, verschenen er toch nog enkele zieke planten, hoewel deze aangetaste zaden na 8 uur al nagenoeg hun maximum hoeveelheid water hadden opgenomen (fig. 31). Hier speelt dus niet enkel het gezwollen zijn van de zaden vóór de behandeling een rol, doch de duur van het voorweken.

Mogelijk moet hierbij gedacht worden aan een gevoeliger worden van de schimmel na een bepaalde tijd van weken. Steun aan deze gedachte geeft een

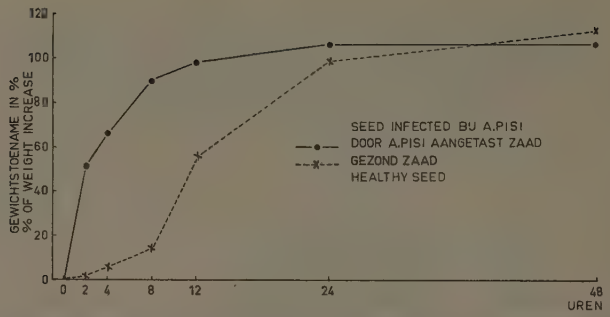


FIG. 31. Gewichtstoename van gezonde en door Ascochyta pisi aangetaste erwten, ras Eminent, geweekt in water bij 23°C.
Increase in weight of healthy peas and peas infected by Ascochyta pisi, soaked in water at 23°C (48 hours).

proef, uitgevoerd door mejuffrouw Dr. A. KAARS SIJPESTEIJN,[1]) waaruit bleek, dat een in groei verkerende schimmel, in de vorm van kiemende sporen, gevoeliger was voor rimocidine dan niet kiemende sporen. Voedingsoplossingen met opklimmende concentraties rimocidine werden geënt met een mengsel van 2 delen sporen van een bruinsporige, methionine deficiente mutant, en 1 deel sporen van een zwartsporige, normale *Aspergillus niger*. De oplossingen bevatten glucose, doch geen methionine. Na 2 dagen bleek bij de concentraties rimocidine van 1 p.p.m. en hoger geen kieming te zijn opgetreden. Uit de buizen, waarin geen kieming had plaats gehad werd op methionine bevattende petrischalen een hoeveelheid suspensie afgestreken. Wanneer geen rimocidine gebruikt zou zijn, mochten hieruit, blijkens controleproeven, 25 zwarte en 50 bruine kolonies verwacht worden. Er werden echter gemiddeld ongeveer één zwarte en ± 30 bruine kolonies aangetroffen. De normaal groeiende zwarte *Aspergillus niger* werd dus door rimocidine nagenoeg geheel gedood, en de zonder methionine niet groeiende mutant slechts voor 40%. Wanneer dit eveneens zou gelden voor rustend en actief groeiend mycelium, dan is het denkbaar dat de schimmel door voorweken in water gevoeliger wordt voor het antibioticum.

Uit fig. 31 blijkt, dat door *Ascochyta pisi* aangetaste zaden sneller water opnemen dan gezonde zaden, maar dat de totale wateropname iets minder is.

De curves verliepen analoog, wanneer in plaats van water een 100 p.p.m. rimocidine oplossing gebruikt werd. Hoewel na 8 uur de wateropname het maximum reeds bijna bereikt heeft, is de ontsmetting op dat moment nog onvoldoende. Zelfs na 16 uur weken is het effect nog duidelijk minder dan na 24 uur (tab. 19). Nadat het zwellen van het zaad voltooid is, moeten de zaden dus nog enige tijd in de oplossing blijven teneinde voldoende ontsmet te worden.

Gezien de omstandigheid, dat een oplossing sneller binnendringt in zwaar aangetaste zaden dan in gezonde zaden, en ook de uiteindelijke antibioticumconcentratie in aangetaste zaden hoger ligt (IV, 4), zou men de vraag kunnen stellen of zwaar aangetaste zaden dan ook relatief beter ontsmet worden dan zeer licht aangetaste zaden. De laatste, van welke het weefsel nog nagenoeg

[1]) Organisch Chemisch Instituut T.N.O. te Utrecht.

geheel intact is, zouden zich wat betreft de bovengenoemde punten, meer als gezonde zaden gedragen. Om dit te onderzoeken werden met behulp van een ultraviolette lamp uit een partij Eminent zaad de volgende categorieën zaden uitgezocht.

a) gezond: géén oplichten.

b) licht ziek: slechts klein oplichtend stipje of vlekje.

c) matig ziek: oppervlak oplichtend voor meer dan 1/3, doch voor minder dan 2/3.

d) zwaar ziek zaad: meer dan 3/4 van het oppervlak oplichtend.

Van elke categorie werden 100 zaden gedurende 24 uur geweekt in water of rimocidine 100 p.p.m., en uitgezaaid in bakjes met gestoomde grond. Het aantal opgekomen en zieke planten is weergegeven in tabel 42.

TABEL 42. Invloed van de graad van aantasting op de mate van ontsmetting. Ras Eminent. 100 aangetaste zaden per object, 24 uur geweekt in rimocidine, ruw 76%, 100 p.p.m.

Table 42. Influence of the degree of infection on the rate of disinfection. Variety Eminent. 100 infected seeds per treatment, soaked in rimocidin, crude 76%, 100 p.p.m. for 24 hours.

graad van aantasting der zaden *degree of infection of the seeds*	% opgekomen planten *% plants emerged*		% zieke planten *% diseased plants*		
	water	rimocidine	a) water	b) rimocidine	a/b
gezond . . . . . *healthy*	95	96	4	1	4
licht ziek . . . . . *slightly diseased* . . .	91	93	6	1	6
matig ziek . . . . . *moderately diseased*	78	79	25	3	8
zwaar ziek . . . . . *heavily diseased*	61	77	35	2	17

De verhouding tussen het aantal zieke planten in het waterobject en dat in het rimocidine-object is het grootst bij de zwaar aangetaste zaden. Hier komt dus het merkwaardige feit naar voren, dat het percentage zieke planten uit zwaar aangetaste zaden door rimocidine in sterker mate verminderd wordt dan dat uit zeer licht aangetaste zaden. In verband met het sneller binnendringen in aangetast weefsel is dit evenwel begrijpelijk.

6. BESPREKING

Door cotylen, zaadhuiden en kiempjes van in een antibioticumoplossing geweekte zaden afzonderlijk te extraheren en het extract te onderzoeken op fungicide werking, werd een indruk verkregen van de verdeling van het antibioticum over het zaad. Hieruit bleek dat in de zaadhuid en het kiempje een concentratie bereikt wordt van 50 à 75 p.p.m., in de buitenste lagen der cotylen een concentratie van 25 à 40 p.p.m., en in het binnenste der zaden ongeveer 5 p.p.m. Er bestaat dus een sterke afname in antibioticumconcentratie naar het midden van de erwt.

In hoofdstuk I is aangetoond dat het merendeel der zieke kiemplanten ont-

staat doordat mycelium vanuit de zaadhuid het kiempje aantast tijdens de kieming, en een deel doordat het kiempje vóór de kieming reeds aangetast is. Het is moeilijk denkbaar dat na weken der zaden in rimocidine eventueel overlevend mycelium in de zaadhuid of in de cotylen nog tot aantasting van het kiempje in staat zou zijn. In hoofdstuk II (fig. 23) is nl. beschreven dat jong mycelium niet kan uitgroeien op een voedingsbodem met 50 p.p.m. antibioticum, een concentratie die ook in het kiempje bereikt wordt. De enkele zieke planten, die na behandeling nog verschijnen, moeten derhalve uit kiempjes gegroeid zijn, die reeds vóór het zaaien aangetast waren.

Het feit, dat het mycelium niet in alle kiempjes gedood wordt, moet mogelijk verklaard worden door een variatie in gevoeligheid voor het antibioticum bij de schimmel. In dit verband kan opgemerkt worden dat rimocidine een veel beter effect had op kiemende sporen dan op niet kiemende. Een andere mogelijkheid is een ongelijke verdeling van het antibioticum over de kiem, zodat de dodelijke concentratie niet overal bereikt wordt.

Rimocidine en pimaricine gedroegen zich verschillend wat de binding in het zaad betreft. Pimaricine diffundeerde nl. gemakkelijker uit behandelde zaden, wanneer deze op agar uitgelegd werden, waardoor grotere remmingszones verschenen dan om zaden, die op overeenkomstige wijze met rimocidine behandeld waren.

SAMENVATTING

Verschillende planteziekten kunnen met de tegenwoordig in gebruik zijnde bestrijdingsmiddelen onvoldoende bestreden worden. De oorzaak hiervan ligt in de omstandigheid dat de betreffende parasieten zich inwendig in de plant of het zaad bevinden, en daardoor voor deze middelen niet bereikbaar zijn. Voor een succesvolle bestrijding zijn hier stoffen nodig, die in de plant of het zaad kunnen binnendringen en daar de parasiet doden zonder schadelijke nevenwerkingen.

In het kader van de werkzaamheden van de Werkgroep voor Inwendige Therapie bij planten T.N.O., is op het Laboratorium voor Phytopathologie te Wageningen onderzocht of antibiotica een oplossing zouden kunnen bieden voor het hier genoemde probleem. Als proefobject is erwtezaad gebruikt, dat door de schimmel *Ascochyta pisi* aangetast was. Deze schimmel bevindt zich tot diep in het zaad en ontsmetting met de gebruikelijke middelen heeft dan ook weinig resultaat. In de volgende korte samenvatting is afgeweken van de in de inhoud aangegeven indeling.

De toegepaste antibiotica, nl. rimocidine en pimaricine, hadden reeds in lage dosering een sterke fungicide werking. Uit onderzoek betreffende het absorptiespectrum in het ultraviolet bleek dat pimaricine evenals rimocidine tot de polyenen behoort. In daglicht werd voor beide antibiotica een overgang van de fungicide transvorm naar de weinig of niet actieve cis-configuratie geconstateerd.

Door weken der zaden gedurende 24 uur in een oplossing van ongeveer 75 delen per millioen werd het percentage zieke planten uit deze zaden van 30 à 40 % tot 1 à 2 % teruggebracht zonder dat de kieming der zaden hierdoor verminderd werd. Op verschillende wijze is getracht de ontsmettende werking op te voeren; een 100 % ontsmetting kon evenwel niet bereikt worden zonder dat remming van de kieming optrad.

Toediening der antibiotica in droge of semi-droge vorm gaf minder goede resultaten, vermoedelijk door afspoeling in de grond. Ook in veldproeven werd het aantal zieke planten door antibioticumbehandeling op overeenkomstige wijze verminderd. Het geoogste zaad uit het behandelde object vertoonde 6–7 maal zo weinig aantasting als dat uit het niet behandelde object.

De werking van pimaricine is mogelijk iets beter dan die van rimocidine. Bij beide antibiotica is een duidelijke marge aanwezig tussen de concentratie waarbij de schimmel gedood wordt en die, waarbij schade optreedt.

Voor het onderzoek naar de wijze, waarop de inwendige ontsmetting plaats heeft en het effect dat ermee bereikt kan worden bleek het noodzakelijk het parasitisme van de schimmel nader te bestuderen. Uit proeven met het ras Eminent konden de volgende conclusies getrokken worden:

1. Bij 80% der aangetaste zaden bevond de schimmel zich dieper dan de zaadhuid en bij ruim 40% was ook het kiempje aangetast.
2. Een deel der zieke planten groeide uit kiempjes, die reeds voor het zaaien aangetast waren, doch het merendeel ontwikkelde zich uit kiempjes die pas tijdens de kieming door mycelium vanuit de zaadhuid aangetast werden.
3. De schimmel kon veelvuldig over grote afstand aangetroffen worden in planten of plantedelen waarop geen symptomen te zien waren. Het is aannemelijk dat in het zaad aanwezig mycelium met het topmeristeem van het kiempje omhooggroeit, een „ketting van mycelium" in de plant achterlatend.
4. Zaden van planten zonder symptomen konden langs inwendige weg aangetast worden door mycelium, dat reeds vanaf het jeugdstadium in deze planten aanwezig was.
5. De verspreiding van de schimmel in het veld geschiedde met regen en wind, en over een afstand die afhankelijk was van de windkracht. In de meeste gevallen bedroeg deze afstand vanuit een kleine infectiebron niet meer dan enkele tientallen centimeters in één periode.

Met behulp van extractie van behandelde zaden kon aangetoond worden dat beide antibiotica tot in de cotylen en het kiempje kunnen doordringen. De in de zaadhuid aangetoonde antibioticumconcentraties moeten in het algemeen voldoende geacht worden om al het mycelium in de zaadhuid te doden. Ook de concentratie in de kiempjes is zo hoog dat myceliumgroei nagenoeg onmogelijk geacht moet worden. Dat desniettemin steeds enkele kiempjes onvoldoende ontsmet werden moet misschien verklaard worden door een variatie in gevoeligheid voor het antibioticum bij de schimmel of een ongelijke verdeling van het antibioticum over het kiempje.

Hoewel *Ascochyta pisi* in één seizoen door zaadontsmetting met deze antibiotica niet volledig geëlimineerd kan worden, is het niet onmogelijk, dat de aantasting door jaarlijkse ontsmetting van het zaaizaad op een zo laag niveau gebracht kan worden, dat de door deze schimmel veroorzaakte schade van geen betekenis meer is.

SUMMARY

Introduction

Of late years increasing attention has been paid to the possibility of using antibiotics for the control of plant diseases. Apart from a fungicidal or bactericidal effect, several of these antibiotics also possess the property of penetrating more or less easily into plants or seeds. This offers the possibility of combating internal pathogens.

As a member of the Working Party for Internal Therapy of Plants, I studied the disinfection of seeds which were internally attacked by fungi. In this work peas were used which were infected by *Ascochyta pisi*. This fungus can penetrate deep into the seed and thus superficial treatments do not give adequate control.

During tests of a number of antibiotics and culture fluids derived from micro-organisms disinfection was very successful when infected seeds were soaked in a culture liquid from *Streptomyces rimosus* (tab. 12). Further study showed that the active substance in this liquid was the antibiotic rimocidin discovered by DAVISSON c.s. (1951). Later a new antibiotic was discovered at the „Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek", Delft, Holland. It was produced by *Streptomyces natalensis* [1]) and called pimaricin. It appeared to be related to rimocidin and has therefore been included in the investigations. In the following review the results are not presented in the same order as in the Dutch contents.

Properties of the antibiotics rimocidin and pimaricin

Both antibiotics have a strong fungicidal but no bactericidal action. Spore germination and mycelial growth of the fungi *Ascochyta pinodella*, *Mycosphaerella pinodes* and *Ascochyta pisi* were inhibited at 6 p.p.m. and 50 p.p.m. respectively (fig. 23). In paper-disc assay pimaricin gave larger inhibition zones than rimocidin (tab. 13), but when the antibiotic was mixed through the agar, rimocidin was somewhat more effective (tab. 14, tab. 15).

The maximum solubility of rimocidin sulphate and pimaricin in distilled water is about 60 p.p.m. At 80°C. the solubility increases over 100 p.p.m. The solubility of pimaricin in the lower alcohols is small (2000 p.p.m. in methanol); that of rimocidin sulphate is a little greater (4000 p.p.m. in methanol). The Sodium salt of pimaricin has an initial water solubility of 6%, but precipitates again after a short time.

On the basis of its absorption spectrum in the ultra-violet, pimaricin should be classified among the polyenes, more particularly in the tetraenes, which also include rimocidin, antimycoïn, nystatin and chromin. The fungicidal effect decreased rapidly when the antibiotics in solution were kept in the light (fig. 24, tab. 16). Measurements of the ultra-violet absorption-spectra before and after exposure to daylight for 10 days showed that under the influence of the light a transition from trans- to cis-configuration had taken place in the tetraenes (fig. 21). When investigated by the paper chromatographic method rimocidin and pimaricin behaved differently (fig. 20).

[1]) Neth. Patent 205.345

Seed-disinfection by soaking

Two methods were used for the assessment of the effects of the antibiotics on *Ascochyta* infection of peas, after the seeds had been soaked in solutions of the compounds. In the first method the seeds were placed on moist filter paper in a flat tray covered by a glass plate, and a count was made of the number of seeds from which the mycelium grew. This method is called the filter paper test. In the second method the seeds were sown in flats of steamed soil, and the number of diseased plants which developed was counted. (By a diseased plant is meant – unless stated else – a diseased plant arising from a diseased seed.)

These tests showed that the seeds could be disinfected most satisfactorily by soaking them in a solution of 75 p.p.m. of one of the two antibiotics in pure condition or an equivalent of the crude antibiotic, for 24 hours. In a heavily attacked seed sample of the variety Eminent the percentage of seeds on which mycelium grew out in the filter paper test was reduced from 80% to 1–5% (fig. 26, fig. 29), the number of diseased plants was reduced from 15–40% to 0.5–1.5% (tab. 17, tab. 24).

Although the disinfecting influence of the two antibiotics was very great, the fungus was not completely eradicated. Increasing the concentration of the antibiotic did not produce the desired result, while there was also the risk of retarding the germination (tab. 18).

By lengthening the duration of the soaking to 48 hours it was possible to obtain complete disinfection, but germination was impaired (tab. 19). Attempts to increase the penetration of the antibiotics by adding surface-active agents or glycerine to the solutions were unsuccessful. As Swedish research workers had reported that seeds attacked by *Ascochyta pisi* could be disinfected with warm water, attempts were made to obtain a complete disinfection by combining this method with an antibiotic treatment. These also were unsuccessful, and a warm water treatment alone appeared to have little effect (table 22).

Finally, the influence of the pH and the temperature of the antibiotic solution was investigated. The former appeared to have little effect (fig. 28) but the temperature had a clear influence (fig. 27). Soaking in an antibiotic solution of 100 p.p.m. at 35°C for 24 hours gave complete disinfection, but this temperature was very detrimental to germination. This was also impaired at 30°C. A temperature which is a little above room temperature (about 25°C) is considered the most suitable. There are indications that shaking during soaking increases the effect of the antibiotics (tab. 20, tab. 21). By this means the number of diseased plants derived from a seed lot, showing 80% infection with *Ascochyta pisi*, could be reduced to 0.6%, but in this case also, disinfection was not complete. In general, pimaricin had a somewhat stronger disinfecting influence than rimocidin although the differences were very slight. However, pimaricin also had a phytotoxic effect at a slightly lower concentration than rimocidin. When pimaricin was used the germination was retarded at 150 p.p.m.; with rimocidin only at 200 p.p.m. or more (tab. 30, tab. 31).

At this concentration the ultimate emergence was not or only slightly inferior to that when untreated seeds were used (fig. 30). Since the two antibiotics are effective at 75 p.p.m., the interval between the *dosis curativa* and the *dosis tolerata* is fairly considerable. Glasshouse and field trials with plants grown to maturity from seed treated with either antibiotic showed no detrimental effect of the antibiotic treatment (tab. 32, tab. 33).

Development of diseased plants from seeds attacked by Ascochyta pisi

In order to gain more information on the way in which the internal disinfection takes place and on the presence of viable mycelium in a small percentage of the treated seeds it was necessary to examine, on the one hand the development of diseased plants from infected seed, and on the other the penetration of the antibiotics into the seed.

Using the variety Eminent, which is very susceptible to the disease, an investigation was made of the way in which *Ascochyta pisi* occurs in seeds and in diseased plants and also of the distribution of the fungus from these diseased plants in the field and the attack on the pods.

When infected seeds are sown, seedlings emerge on which no symptoms can be observed. A few days after emergence a greyish spot appears, mostly on the epicotyl but often also on the leaves. It develops rapidly into a sunken patch with a dark brown edge and a lighter coloured centre (fig. 17). When seeds which had been pre-soaked in water were sown in steamed soil in the glasshouse, these symptoms usually appeared after 10 to 15 days (fig. 1).

Of one sample of seeds of the variety Eminent showing 80% seed infection, nearly one-third failed to germinate, over one-third gave rise to diseased plants and one-third gave apparently healthy plants. When the cotyledons, embryos and seed coats of another sample of seed from the same batch were placed separately on moist filter paper it was found that in 80% of the diseased seeds the fungus had penetrated deeper than the seed coat, and in more than 40% of the seeds it had entered the embryo (tab. 1). In a trial with seeds from which the seed coat had been removed 5% diseased plants were obtained, and from non peeled seeds 17.5%. Most of the diseased plants therefore became infected by the growth of mycelium from the seed coat into the embryo. By digging up seeds at different times, peeling them and sowing them again it could be ascertained at what time this took place. In pre-soaked seeds sown in the glasshouse at 20°C it appeared to occur on the 2nd and 3rd day after sowing (tab. 2).

Presence of Ascochyta pisi in plants or parts of plants without symptoms

Anatomical examination showed that in stem lesions the fungus occurs exclusively in the epidermis and outer layers of the cortex. The cells are destroyed and collapse so that the stem is locally depressed. The pycnidia arise in these depressions (figs. 3, 4, 5, 6, 7, 8). Isolations from diseased plants developed from infected seeds showed that the fungus often occurred on parts of plants which were free of lesions. If a lesion occurred on the epicotyl, mycelium of *Ascochyta pisi* mostly grew from all parts of the epicotyl lying between the cotyledons and this lesion (fig. 19). Often, mycelium was also found above similar single spots on the epicotyls (tab. 9). The fungus was also isolated from 50 plants out of 128 which did not show symptoms but which had developed from a batch of heavily infected seed (fig. 2). It was also possible to demonstrate the presence of the mycelium of the pathogen on such plants by microscopical examination (fig. 9), but this was often difficult since the mycelium was usually very sparse. The observations suggest that the fungus grows upwards with the meristem of the embryo, thus leaving behind in the stem a chain of mycelium which may of may not be interrupted. That this chain can be very long appeared from trials in which plants from infected seed were raised in darkness. Long

brown stripes were observed on the epicotyls of some plants and *Ascochyta pisi* could always be isolated from these stripes (fig. 18.)

Infection of the seeds by mycelium from plants without symptoms

The question arose whether this mycelium occurring in the plant would be capable of attacking the seeds borne on such plants. For this purpose infected seeds were sown in an isolated glasshouse and after emergence the diseased plants were rejected. No *Ascochyta pisi* was observed on the rest of the plants during the whole growing season, and the harvested pods were apparently healthy. The seeds from these pods were disinfected externally with corrosive sublimate and placed on moist filter paper. After over 10 days incubation, *Ascochyta pisi* was isolated from 2 out of more than 500 seeds thus demonstrating that a small proportion of the seed had become internally infected.

Effect of environmental conditions on the number of diseased plants

The numbers of diseased plants obtained from different samples of one seed lot varied considerably. From trials in Wisconsin-tanks it was shown that at higher soil temperatures less diseased plants developed than at lower temperatures (tab. 5). When swollen seeds were sown, the soil temperature on the second and third day after sowing appeared to exert a decisive influence (tab. 4). It has already been stated that in this period the embryo may be attacked by mycelium growing from the seed coat. It thus seems possible that the more rapid germination at higher temperatures enables a higher proportion of the embryos to escape infection.

Light intensity also exerted an influence on the number of diseased plants, there being less infection of the young plants at lower light intensities (tab. 7, tab. 8). It is possible that the physiological condition of the plant plays a part in this connection or that the quicker growth of the stem under low light intensity causes the mycelium to be disrupted. No influence of the moisture content of the soil could be established.

Penetration of the antibiotics into the seeds

Both pimaricin and rimocidin (but especially the latter) are strongly absorbed by the tissue of the pea seed. It was thus not possible to estimate the antibiotic content of the seeds by means of inhibition zones around pieces of tissue placed on agar. The antibiotics were, therefore, first extracted from the various seed tissues and the inhibition zone tests were made on the solutions thus obtained.

It was found that healthy peas absorbed at least 13 γ of either antibiotic per pea when soaked for 24 hours in a solution of 100 p.p.m. (tab. 36). In the seed coats and embryos there was a concentration of 50–75 p.p.m., in the outer parts of the cotyledons 25–40 p.p.m. and in the interior of the seeds no more than 5 p.p.m. (tab. 37, tab. 38, fig. 25). It was also established that more antibiotic substance penetrated into diseased than into healthy peas and more into the attacked parts than into healthy parts of the seeds (tab. 39). The concentrations in diseased tissue are thus probably greater than those found in healthy peas. These results apply both to rimocidin and to pimaricin.

Seeds were soaked in 100 p.p.m. rimocidin and the seed coats, cotyledons

and embryos incubated separately. Mycelium grew from 8% of the seeds, 5% of the embryos and 7% of the cotyledons (tab. 40). The fungus grew from a lower percentage of intact seeds, presumably because the seed coat continued to envelop the seed and contained much antibiotic substance (tab. 41). It has already been stated that most diseased plants develop from embryos which are attacked by mycelium growing from the seed coat during germination. It seems most unlikely that any viable mycelium remaining in the seed coat or the cotyledons after rimocidin treatment would be capable of attacking the embryo, since it has been shown *in vitro* that mycelial growth is greatly inhibited by a low concentration of antibiotic whereas the antibiotic concentrations in the vicinity of the embryo is fairly high. It can be concluded, therefore, that in the few seeds escaping the antibiotic treatment the embryos had already been attacked before germination. Though, in the embryo there is an average concentration of 50–75 p.p.m. which kills growing mycelium, some of the mycelium survives. It seems possible either that there is an uneven distribution of the antibiotic in the embryo or that resting mycelium has a high resistance to antibiotics. In this connection it should be noted that *in vitro* tests have shown that non-germinating *Ascochyta* spores were less easily killed by rimocidin than those which had already germinated.

Spread of Ascochyta pisi in the field

The effect of a small number of diseased plants on the occurrence of *Ascochyta pisi* in the field has been ascertained. For this purpose a number of plots, each one metre square, were sown with healthy seed; four were situated behind an orchard and were thus protected, and four were in an open field. The peas were sown on 12th April 1955; on 9th May a flower-pot was placed in each plot, each pot containing 1, 2, 3 or 4 plants, bearing heavily sporulating lesions of *Ascochyta pisi*. The next day there were high winds with showers and after a fortnight the first symptoms occurred on neighbouring plants. In the 15th day there were again heavy rains which resulted in a widespread increase in the number of diseased plants from the 28th day. The amounts of disease at that time are shown in the figures 12 and 13. Shortly before the harvest the disease had in most cases spread over the greater part of the plot; the seed harvested had been attacked to the extent of 25–50%. The results of this experiment suggest that the spread of the disease occurs during rainy weather and in the direction of the wind. The distance over which the spores are disseminated is increased with an increase in wind velocity. The distance amounted to 7 cm. on average and 12 cm. maximally in protected plots and to 20 cm. on average and 65 cm. maximally in the open field. The smallest source also produced the smallest final amount of disease.

In a more comprehensive experiment (fig. 10, fig. 11) in which the source consisted of 50 diseased plants the spores covered a distance of 3.50 meters.

Ascochyta pisi on pods without clearly marked spots

In field trials a gradual building up of the fungus population could be observed. Apart from the attack in the form of typical clearly marked spots, during and after maturation a type of attack occurred which was characterised by the pycnidia not being localized in clearly marked spots but being distributed over

the whole pod (fig. 14, 15 and 16). It appears that growth of *Ascochyta pisi* on dead or dying pod tissue is different from that on living green tissue. On living tissue a clearly marked spot is formed but on moribund tissue the fungus develops without restriction. In field trials it was established that more than three quarters of the infected seeds were derived from pods with the „diffuse" type of attack (tab. 10). This indicates that most of the seeds were attacked during and after maturation. The weather shortly before and after the harvest and the way in which the plants dry in the field after harvesting will thus greatly influence the degree of attack of the seed. This argument probably also holds for *Mycosphaerella pinodes* and *Ascochyta pinodella* as also for these fungi a diffuse type of attack has been found.

Effect of seed-treatment with antibiotics on disease incidence in the field

From the foregoing it is clear that a small number of diseased plants developed from diseased seeds in an unfavourable season can increase the fungus population during the growing season to such a level that a mass attack of seed can take place. From trials in which the distribution of the fungus in the field has been ascertained, it has been computed that in the case of a susceptible variety like Eminent a percentage seed attack of $2\frac{1}{2}$ to 5% can, in a rainy season, yield a product of which 20–50% is attacked. Glasshouse trials have shown that treatment with rimocidin will reduce the number of diseased plants by twenty times. It is thus estimated that the treatment of a 20% infected sample of seed would so reduce the number of infected plants produced, that heavy seed infection would not occur.

This estimate is confirmed by the results of the field trials carried out in 1956 using three seed samples of the susceptible variety Eminent with respectively 10%, 30% and 80% infection. A large number of diseased plants grew from the control seed treated with water, and the disease spread considerably in the field, resulting in a heavy attack on pods and seeds.

Only a very few diseased plants occurred in the rimocidin treatments. The percentage of diseased seeds in the crops harvested from the plots grown from rimocidin treated seed with initial infection contents of 10 or 30%, was 6 to 7 times less than from the controls. However, in the case of the plot grown from 80% infected seed, the reduction was only 2.5 times (tab. 29). Since seed will rarely be sown with more than 20% *Ascochyta* infection, it can be concluded that even in a very susceptible variety in a rainy year an attack by *Ascochyta pisi* in the field can be greatly suppressed by soaking the seed for sowing in rimocidin.

Other methods of application of the antibiotics to the seeds

As soaking the seeds is not suitable for commercial practice, other methods of antibiotic treatment have been tested. The application of rimocidin as a powder (tab. 26) reduced the number of diseased plants by 40–80%; application of the antibiotics as a slurry gave a reduction of 60–95% (tab. 25) and the treatment of the seeds with a very small quantity of antibiotic suspension in methanol gave a reduction of 50–95% (tab. 27). The effect of these treatments is, therefore, less certain and more subject to variation than that of soaking the seeds in aqueous solutions of the antibiotics, which produces a disease reduction

of more than 95%. Other seed disinfectants at present used in practice have little or no effect against *Ascochyta pisi* in peas (tab. 34, tab. 35).

Some tests have been made of the effect of rimocidin and pimaricin against certain other seed-borne diseases which are difficult to control. They have proved very effective in some cases, e.g. against *Phoma betae* on beet seed. The antibiotics were not effective against loose smut of wheat or barley.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was made possible by a grant from the Organizations for Applied Scientific Research (T.N.O.) and Pure Scientific Research (Z.W.O.) and carried out under the direction of Prof. Dr A. J. P. OORT, to whom I am greatly indebted. My thanks are also due to Dr M. H. VAN RAALTE for his continued interest. I should like to thank Chas. Pfizer & Co., Inc., New York, for providing rimocidin and the „Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N.V.", Delft, Holland, for providing pimaricin.

ARK, P. A., – 1947. Phytopathology 37: 842.
ARK, P. A., – 1949. In: Streptomycin, its nature and practical application, by S. A. Waksman: 607–612.
ARK, P. A., – 1954. Calif. Agr. 8: 7–8.
ARNY, D. C. & C. LEBEN, – 1954. Phytopathology 44: 481.
BARTON, L. V. & J. MC NAB, – 1954. Contrib. Boyce Thompson Inst. 17: 419–434.
BAUMANN, G., – 1953. Kühn Archiv 67: 305–383.
BAUMANN, G., – 1954. Nachr.Bl. f. d. dtsch. Pfl. Sch. Dienst 8: 61–69.
BONDE, R., – 1953. Phytopathology 43: 463.
BONDARTZEVA-MOTEVERDE, V. N. & N. I. VASSILIEVENSKY, – 1937. U.S.S.R. Acad. Sci. Press, Moscow.
BREMER, H., – 1955. Nachr. Bl. des dtsch. Pfl. Sch. Dienst 7: 129–131.
BUTLER, E. J. & S. G. JONES, – 1949. Mc Millan & Co., Ltd., London.
CHINN, S. H. F. & R. C. RUSSELL, – 1956. Can. J. Agr. Sci. 36: 1–7.
DARPOUX, H. & A. FAIVRE-AMIOT, – 1948. C. R. Acad. Sci. 226: 1046.
DARPOUX, H. & A. FAIVRE-AMIOT, – 1949. Ann. Inst. Pasteur 76: 72.
DARPOUX, H. & A. FAIVRE-AMIOT, – 1950. C. R. Acad. Agr. 36: 158–161.
DAVISSON, J. W., e.a., – 1951. Antib. and Chemother. 1: 289–290.
DEKKER, J., – 1955. Nature 175: 689.
DEKKER, J., – 1955. Meded. Dir. Tuinbouw 18: 623–638.
DE TEMPE, J., – 1955. De Nieuwe Veldbode, 3 febr.: 321–324.
GADD, I., – 1950. C. R. Ass. Int. Ess. Sem. 16: 1–94.
GOODMAN, J. J. & A. W. HENRY, – 1947. Science 105: 320–321.
GOTTLIEB, D., e.a., – 1955. Plant Dis. Rep. 39: 219.
GRANITS, J. & A. JANKE, – 1954. Zbl. Bakt. II, 108: 47.
GRAY, R. A., – 1956. Phytopathology 46: 105–111.
GROSSO, J. J., – 1954. Plant Dis. Rep. 38: 333.
GRÜMMER, G. & F. MACH, – 1955. Zbl. Bakt. Paras. Infekt. und Hygiene II, 108: 449–464.
HANNA, W. F. & W. POPP, – 1935. Proc. World's grain Exh. and Conf. Regina Sask. 1933: 243–248.
HEBERT, T. T., – 1955. Plant Dis. Rep. 39: 20–22.
HEBERT, T. T., – 1956. Phytopathology 46: 14.
HEUBERGER, J. W. & P. L. POULOS, – 1953. Plant Dis. Rep. 37: 81–83.
HICKMAN, C. J., – 1941. Rep. Agr. Hort. Res. Stat. Bristol 1940.
HILBORN, M. T., – 1953. Phytopathology 43: 475.
HILDRETH, R. C. & G. H. STARR, – 1950. J. Colo-Wyo. Acad. Sci. 4: 58.
JACOBSON, M. J., – 1954. Am. Chem. Soc. 76: 4606–4608.
JENSEN, J. L., – 1888. J. Roy. Agr. England II, 24: 397–415.
JONES, L. R., – 1911. Wisconsin Agr. Exp. Stat. 28th Ann. Rep.: 23.
JONES, L. K., – 1927. N.Y. St. Agr. Exp. Stat. (Geneva) Bull. 547.
KEYWORTH, W. G., – 1957. In: Ann. Appl. Biol. 45, 1: 208–215.
KLINKOWSKI, M., – 1952. Mitt. Biol. Zentr. Anst., Heft 74: 19–22.
KLINKOWSKI, M., – 1953. Kuhn Archiv 67: 33–49.
KLINKOWSKI, M., – 1955. Kongressbericht Pflanzensch. Kongr. Berlin 11–16 Juli 1955.
KLINKOWSKI, M., H. KÖHLER & H. SCHRÖDTER, – 1955. Phyt. Zeitschr. 23: 345–380.
KRASILNIKOW, N. A., – 1953. Bull. Acad. Sci. U.S.S.R.: 49–66.
KRÜGER, F., 1895. Cbl. Bakt. Abt. II, 1: 620–624.
LEBEN, C. & D. C. ARNY, – 1954. Phytopathology 44: 329.
LEBEN, C., R. W. SCOTT & D. C. ARNY, – 1956. Phytopathology 46: 273–277.
LECHEVALIER, H., – 1953. Presse Médicinale 61: 1327–1328.
MARLATT, B., – 1955. Plant Dis. Rep. 39: 213–214.
MIRZOBEKYAN, R. O., – 1952. Rev. Appl. Myc. 31: 621–622.
NOLL, W., – 1940. Zeitschr. Pfl. Krankh. und Pfl. Sch. 50: 49–71.
OGILVIE, L. & B. O. MULLIGAN, – 1932. Rep. Agr. Hort. Res. Stat. Bristol: 103–120.
OORT, A. J. P. & J. DEKKER, – 1955. Meded. Landb. Hogesch. Gent 20: 381–387.
OROSHNIK, W., – 1955. Science 121: 147–149.
PAULUS, A. & G. H. STARR, – 1951. Agron. J. 43: 617.
RATHSCHLAG, H., – 1930. Phyt. Zeitschr. 2: 493–501.
RIEPMA, P. WZN., – 1955. Verslag CILO over 1954: 199–207.
RUSSELL, R. C., – 1953. Proc. Can. Phyt. Soc. 20: 21.
RUSSELL, R. C. & L. E. TYNER, – 1954. Can. J. Agr. 34: 533.

Schrödter, H., – 1954. Angew. Meteor. 2: 23–26.
Smith, W. L., – 1949. J. Colo-Wyo. Acad. Sci. 4: 49.
Smith, W. L., e.a., 1954. Phytopathology 44: 390.
Sprague, R., – 1929. Phytopathology 19: 907–932.
Starr, G. H. e.a., – 1951. Agron. J. 43: 617.
Sutton, M. D. & W. Bell, – 1954. Phytopathology 44: 331.
Thomas, C. A., – 1956. Phytopathology 46: 29.
Timonin, M. I., – 1946. Sci. Agr. 26: 358–368.
Tyner, L. E., – 1951. Sci. Agr. 31: 187–192.
Tyner, L. E., – 1953. Phytopathology 43: 313.
Tyner, L. E., – 1954. Phytopathology 44: 508.
Tytell, A. A. & F. J. Mc Carthy, – 1956. In: Antibiot. Annual 1954–1955: 716–718. Med. Encycl. New York.
Vaartaja, O., – 1954. Phytopathology 44: 509.
Vaartaja, O., – 1956a. Phytopathology 46: 387–390.
Vaartaja, O., – 1956b. Can. J. Bot. 34: 377–388.
Van Hook, J. M., – 1906. Ohio Agr. Exp. Stat. Bull. 173: 231–249.
Waggoner, P. E., – 1956. Plant Dis. Rep. 40: 411–413.
Wallen, V. R., M. D. Sutton & A. J. Skolko, – 1950. Phytopathology 40: 156–160.
Wallen, V. R. & A. J. Skolko, – 1950. Can. J. Res. C. 28: 623–636.
Wallen, V. R. & A. J. Skolko, – 1951. Can. J. Bot. 29: 316–323.
Wallen, V. R. & A. J. Skolko, – 1953. Plant Dis. Rep. 37: 421.
Wiles, A. B. & J. C. Walker, – 1951. Phytopathology 41: 1059–1064.
Wollenweber, H. W. & H. Hochapfel, – 1936. Zeitschr. Parasitenk. VIII: 561.
Zechmeister, L., – 1954. Experientia 10: 1–11.
Zemanek, J. & P. Bartos, – 1956. Zemedelskych Ved. 29: 107–124.